UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1963 N° 56

CONTRIBUTION A L'ETUDE des anticorps au cours de la Trypanosomiase africaine A T. Gambiense

Travail du Laboratoire de Biochimie médicale de la Faculté de Médecine de DAKAR
(Docteur MASSEYEFF, Maître de Conférence agrégé)

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1963

PAR

Jacques GOMBERT
Ancien Interne des Hôpitaux

MEMBRES DU JURY.

MM.	VALDIGUIÉ,	*Président.*
	ANDRIEU	*Assesseurs.*
	BOUISSET	
Mme	ENJALBERT	
M.	DOUSTE-BLAZY,	*Suppléant.*

IMPRIMERIE TOULOUSAINE Vve LION
16, RUE LAKANAL, 16
TOULOUSE

1963

CONTRIBUTION A L'ETUDE

DES ANTICORPS AU COURS DE LA TRYPANOSOMIASE AFRICAINE A T. GAMBIENSE

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN.	MM.	Lazorthes.
1er ASSESSEUR		Blanc.
2e ASSESSEUR.		Sorel.
DOYENS HONORAIRES.		Gorse, Calvet, Lefebvre, Brustier.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. Ribaut, Vallois, Tapie, Delas, Riser.

SECTION MEDECINE

PROFESSEURS

Clinique médicale.	MM.	Mériel,
Clinique médicale.		Gadrat.
Clinique chirurgicale et Gynécologie.		Fabre (P.).
Clinique chirurgicale et du Cancer.		Grimoud.
Clinique chirurgicale infantile et Orthopédie		Virenque.
Clinique des Maladies cutanées et syphilitiques.		Bazex.
Clinique des Maladies de la Tuberculose et Pathologie interne.		Morel.
Clinique des Maladies des voies urinaires		Lhez.
Clinique médicale infantile et Puériculture.		Sorel (R.).
Clinique médicale de la Première enfance.		Bardier.
Clinique de Neurologie et Psychiatrie.		Géraud.
Clinique obstétricale.		Guilhem (P.).
Clinique odonto-stomatologique.		Cadenat (H.).
Clinique ophtalmologique		Calmettes.
Clinique O.R.L. et de Chirurgie maxillo-faciale		Calvet.
Rhumatologie.		Ruffié (R.).
Clinique traumatologique des membres.		Rieunau.
Accouchement et Obstétricie sociale		Pontonnier.
Anatomie.		Lazorthes.
Anatomie appliquée.		Poulhès.
Anatomie pathologique		Fabre (J.).
Bactériologie, Hygiène, Médecine sociale.		Andrieu.
Chimie biologique		Valdiguié (P.).
Electro-Radiologie.		Marquès.
Embryologie		Broussy.
Histologie.		Bimes.
Hydrologie thérapeutique et Climatologie		Darnaud.
Médecine légale et du Travail		Planques.
Médecine sociale		Bounhoure.
Parasitologie		Bouisset.
Pathologie chirurgicale		Dambrin.
Pathologie générale et Médecine expérimentale.		Sendrail.
Physico-Chimie		Auvergnat.
Physiologie		Laporte (Y.).
Physiologie appliquée et Pharmacologie.		Baisset.
Physique biologique et médicale.		Bagnard.
Propédeutique médicale.		Laporte (J.).
Thérapeutique		Dardenne.

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Anatomie gén. et comparée..	MM.	Coulouma.
Bactériologie.	Mme	Enjalbert.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Biochimie médicale.	MM.	Douste-Blazy.
Histologie et Embryologie. . . .		Planel.
Ophtalmologie.		Déodati.
Parasitologie.		Ruffié (J.).
Physiologie		Montastruc.
Physique médicale.		Bru.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Anatomie.	MM.	Bastide.
Anatomie pathologique.		Bouissou.
Anesthésiologie		Lareng.
Carcinologie.		Estrade.
Chirurgie générale.		Gédéon.
Electro-Radiologie.		Pons.
Hématologie.		Ducos.
Histologie et Embryologie. . . .		Guilhem (A.).
Médecine générale.		Monnier.
Oto-Rhino-Laryngologie.		Claux.
Pathologie expérimentale. . . .		Gleizes.
Physiologie.		Bessou.
Physique médicale.		Commanay.

AGREGES

Médecine générale.	MM.	Ribaut.
—		Calazel.
—		Rascol.
—		Le Taliec.
—		Ribet.
Chirurgie générale.		Enjalbert.
—		Ficat.
—		Pasquié.
—		Souquet.
—		Safrazin.
—		Gaubert.
Dermatologie - Syphiligraphie		Dupré.
Hydrologie.		Denard.
Médecine légale.		Grèzes-Rueff.
Neurochirurgie.		Espagno (J.).
Neurologie et Psychiatrie. . . .		Gayral.
Obstétrique		Espagno (Guy).
Ophtalmologie.		Bec.
Pneumo-Phtisiologie.		Delaude.

AGREGES LIBRES

Anatomie.	MM.	Thomas.
Pathologie chirurgicale		Deulafé.

SECTION PHARMACIE

PROFESSEURS

Botanique, Cryptogamie.	Mme	Dulucq-Mathou.
Chimie analytique, Toxicologie et Hygiène industrielle.	MM.	Bourbon.
Chimie pharmaceutique.		Blanc.
Matière médicale.		Vincent.
Pharmacie chimique et Pharmacodynamie		Caujolle.
Pharmacie galénique		Stanislas.
Zoologie.		Roux.

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Pharmacie.	M.	Couturier.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Sciences naturelles	Mme	Caujolle.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Microbiologie.	MM.	Breuillaud.
Sciences physiques		Pitet.
Toxicologie.		Broussy G.

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire principal.	MM.	Roche.
Secrétaire.		Berrut.

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats.
(Délibération en date du 12 mai 1891)

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1963 N° 56

CONTRIBUTION A L'ETUDE

des anticorps au cours de la Trypanosomiase africaine A T. Gambiense

Travail du Laboratoire de Biochimie médicale de la Faculté de Médecine de DAKAR
(Docteur MASSEYEFF, Maître de Conférence agrégé)

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1963

PAR

Jacques GOMBERT
Ancien Interne des Hôpitaux

MEMBRES DU JURY.

MM.	VALDIGUIÉ,	*Président.*
	ANDRIEU	*Assesseurs.*
	BOUISSET	
Mme	ENJALBERT	
M.	DOUSTE-BLAZY,	*Suppléant.*

IMPRIMERIE TOULOUSAINE Vve LION
16, RUE LAKANAL, 16
TOULOUSE

1963

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A MON PÈRE

A MA MÈRE

A MA FEMME

A MON FILS

A MA BELLE-FAMILLE

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A MON ONCLE

le Docteur Jacques REY

A qui nous voulons exprimer le profond attachement que nous lui portons.

Il nous a suivi avec affection dès notre enfance et n'a cessé de nous aider au cours de nos études. Ces conseils nous ont été précieux, nous lui devons notre goût pour la médecine.

Nous lui dédions ce travail avec l'expression de notre grande affection et de toute notre gratitude.

A NOTRE MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur P. VALDIGUIÉ

Professeur de Chimie biologique

Vous avez bien voulu vous intéresser à ce travail. Vous nous avez aidé lors de sa mise au point et vous nous avez fait l'honneur d'accepter de présider notre Jury de thèse.

Nous vous remercions pour les conseils que vous nous avez donnés et nous vous prions de croire en notre grande et déférente reconnaissance.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

Monsieur le Professeur G. ANDRIEU

Professeur de Bactériologie,
d'Hygiène et de Médecine sociale
Officier de la Légion d'Honneur

Jeune interne nous avons eu le privilège de vous avoir comme premier Maître. Tout en nous faisant découvrir la pathologie infectieuse, vous nous avez donné le goût de la Biologie et du Laboratoire.

Depuis notre premier stage dans votre Service, vous nous avez montré une bienveillante sollicitude en nous proposant une place d'assistant et, aujourd'hui encore, en acceptant de siéger à notre Jury de thèse.

Nous vous prions de croire à notre gratitude et à notre dévouement.

Monsieur le Professeur BOUISSET

Professeur de Parasitologie
Officier de la Légion d'Honneur

Vous vous êtes intéressé dès le début à nos travaux. Nous en sommes très honoré.

Nous vous remercions d'avoir bien voulu siéger à notre Jury de thèse.

Madame le Professeur L. ENJALBERT

Professeur à la Faculté

Vous nous avez toujours accueilli, que ce soit à votre Laboratoire hospitalier ou à la Faculté, avec une bienveillance qui nous a touché. Vous nous avez prodigué conseils et encouragements.

Nous vous prions de trouver ici une faible marque de notre reconnaissance.

Monsieur le Professeur DOUSTE-BLAZY

Professeur à la Faculté

Vous nous avez donné de nombreux témoignages de sympathie et vous nous avez toujours conseillé amicalement quand nous avions un problème à résoudre.

Nous vous prions de croire à notre fidèle dévouement.

A nos Maitres des Facultés de Médecine
de Dakar et de Bordeaux

A Monsieur le Professeur F. TAYEAU
Doyen de la Faculté mixte
de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux
Professeur de Biochimie médicale
Chevalier de la Légion d'Honneur

Vous avez bien voulu nous suivre avec bienveillance dès le début de nos études médicales.

Nous avons eu la chance de bénéficier de votre brillant enseignement qui nous a fait aimer la biochimie.

Nous vous assurons de notre profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur PAYET
Doyen de la Faculté mixte
de Médecine et de Pharmacie de Dakar
Professeur de Clinique médicale
Chevalier de la Légion d'Honneur

Vous avez été notre tout premier Maître de Médecine. C'est dans votre Service que nous avons pris le premier contact avec la clinique. Votre enseignement nous a toujours grandement aidé.

Vous nous avez ensuite accepté dans le laboratoire de Biochimie de votre Faculté.

Nous sommes heureux d'avoir l'occasion de vous assurer de notre affectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur NEUZIL

Professeur de Biochimie
à la Faculté de Médecine de Bordeaux

Nous avons eu la chance de bénéficier de vos conseils et de trouver auprès de vous un accueil chaleureux.

Maintenant que nous travaillons dans ce Laboratoire de Biochimie de la Faculté de Dakar que vous avez créé, c'est pour nous une grande joie de faire partie de cette famille spirituelle que vous continuez à aider.

Notre gratitude accompagne l'hommage que nous vous faisons de ce travail.

Au Docteur MASSEYEFF

Maître de Conférence Agrégé de Biochimie médicale
à la Faculté de Médecine de Dakar

Vous nous avez fait l'honneur et l'amitié de nous proposer de venir travailler auprès de vous, dans votre laboratoire.

Nous avons beaucoup appris en votre compagnie, et votre dynamisme nous a séduit.

Vous nous avez proposé ce sujet de thèse et vous nous avez tellement aidé dans sa réalisation que ce travail est autant le vôtre que le nôtre.

Nous vous prions de trouver ici un témoignage de notre affectueuse reconnaissance.

A tous nos Maitres de la Faculté et des Hôpitaux de Toulouse

A Monsieur le Docteur LASSERRE
Médecin des Hôpitaux

A qui nous voulons témoigner ici notre particulière gratitude.

A Monsieur le Docteur HEREMANS
et a son collaborateur le Docteur VAERMAN

Qui nous ont accueilli dans leur laboratoire des Cliniques Universitaires Saint-Pierre à Louvain et nous ont fait profiter de leur grande expérience.
Qu'ils en soient remerciés.

A nos camarades du Service de Biochimie médicale de la Faculté de Dakar :

Madame DUTRUGE, Mademoiselle TANGUY,
Monsieur JOSSELIN

A nos camarades de l'Internat des Hôpitaux de Toulouse

En souvenir de quatre années de vie heureuse.

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Biochimie Médicale de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Dakar, sous la Direction du Docteur Masseyeff, Maître de Conférence Agrégé, à qui nous devons de très vifs remerciements pour l'aide constante qu'il nous a prodiguée.

Mais nos remerciements et notre reconnaissance vont à tous ceux qui nous ont aidé à réaliser ce travail, et sans qui il n'aurait pu être mené à bien.

C'est ainsi que nos sérums de Trypanosomés nous ont été fournis :

— par le Docteur Collomb, Professeur de Neuro-Psychiatrie, et par les Docteurs Ayats, Zwingelstein et Philippe, ses assistants ;

— par le Docteur Mattern, Chef de Service à l'Institut Pasteur de Dakar, avec qui nous avons également tenté certains essais d'immunofluorescence ;

— par le Docteur Vidal, Chef de Service de la lutte contre les grandes endémies de la République du Sénégal ;

— par le Pharmacien Capitaine Benz, du Centre Muraz à Bododioulasso (Haute-Volta).

Les sérums normaux utilisés comme témoins pour différentes expériences nous ont été largement fournis

par le Docteur et Madame KANE, du Centre de Transfusion de Dakar.

Les Trypanosomes, dont nous avons fait une si grande consommation, nous ont été fournis par le Laboratoire de Parasitologie de la Faculté (Professeur LARIVIÈRE), et nous tenons à remercier le Docteur HOCQUET, Maître de Conférence Agrégé, et Monsieur DIAGNE, son aide technique, pour nous avoir assuré un approvisionnement régulier.

Messieurs les Docteurs FRIBOURG-BLANC et NIEL ont eu l'extrême amabilité de nous donner du sérum anti-γ-globuline marqué à l'isothio-cyanate.

Monsieur le Professeur CAMAIN, titulaire de la Chaire d'Histologie à la Faculté de Médecine de Dakar, nous a autorisé à utiliser à notre gré les microscopes équipés pour les examens en fluorescence, dont il diposait dans son Service de l'Institut Pasteur et à son Laboratoire de la Faculté.

Mademoiselle PIERME, technicienne de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, a collaboré à la mise au point de la technique d'immunofluorescence.

Mademoiselle RENARD, laborantine du Service de Biochimie Médicale, nous a apporté un concours précieux au cours de la réalisation des tests respirométriques à l'appareil de Warburg,

De même que Monsieur KOUKOUI, aide technique, qui a, en outre, exécuté toutes les analyses immunoélectrophorétiques de contrôle imposées par ce travail.

Monsieur LAPOLICE a assuré, avec zèle, l'entretien des appareils qui nous ont été nécessaires.

Enfin, Madame FAYOLLE, secrétaire, a dactylographié, avec beaucoup de diligence, notre manuscrit et reproduit la plupart des courbes que nous présentons.

INTRODUCTION

La trypanosomiase africaine a longtemps représenté un fléau social majeur pour ce continent. Les campagnes de dépistage des médecins, les opérations de regroupement des villages, les efforts d'assainissement, l'application des découvertes des chimistes et des pharmacologues, ont réduit considérablement l'extension de cette affection, sans pour autant la supprimer. Il ne semble malheureusement pas que l'éradication complète de la trypanosomiase puisse être envisagée dans un proche avenir. Elle demeure donc une maladie actuelle, posant souvent de difficiles questions de diagnostic et de traitement.

Un problème pratique fréquent est celui de la conduite à tenir à l'égard d'un malade évoquant cliniquement la maladie du sommeil, sans qu'il soit possible de mettre en évidence le parasite dans le sang, le liquide céphalo-rachidien ou le suc ganglionnaire. Faut-il considérer un tel sujet comme atteint de trypanosomiase et le traiter avec des médicaments dont la toxicité provoque parfois de graves accidents ? Faut-il, au contraire, laisser évoluer la maladie dans l'attente d'une preuve parasitologique, en courant le double risque de l'apparition de lésions irréversibles et surtout, comme il est fréquent en Afrique, de ne pouvoir retrouver le malade ?

Ce dilemne est plus fréquent qu'on ne l'imagine : il

concernerait de 10 à 25 % des malades, selon les auteurs. L'utilité de tests biologiques applicables au diagnostic de la trypanosomiase apparaît donc clairement.

De nombreux chercheurs se sont efforcés de mettre au point de telles méthodes, qui peuvent être classées sous trois rubriques principales :

— procédés de sensibilisation de la recherche du parasite : c'est essentiellement l'inoculation à l'animal et la culture,

— procédés sérologiques visant à révéler la présence d'un pouvoir anticorps. Presque toutes les techniques usuelles de la sérologie ont été appliquées à la maladie du sommeil avec des fortunes diverses,

— procédés chimiques dans leur essence, conduisant le plus souvent à mettre en évidence un déséquilibre de la répartition des constituants plasmatiques. Les résultats obtenus avec cette catégorie d'examens ne peuvent prétendre à la spécificité, comme ceux des deux premières rubriques.

La recherche dans ces domaines est active à Dakar, capitale du Sénégal, comme il se doit dans un pays où cette endémie existe encore, quoique faiblement. En particulier, l'application de la technique d'analyse immunoélectrophorétique à l'étude des sérums de trypanosomés a permis de faire une constatation très intéressante [118] confirmée à la même époque par les chercheurs de l'Institut Pasteur de Brazzaville [124] : la trypanosomiase africaine provoque une élévation du taux de la β_2-macroglobuline sérique. Ce signe n'est certes pas spécifique, puisqu'il existe fréquemment en Afrique un syndrome d'hyper β_2-macroglobulinémie jusqu'ici cryptogénétique [22]. Mais au cours de la trypanosomiase, il ne manque presque jamais et son intensité est exceptionnelle :

le taux de cette protéine est, en effet, le plus souvent multiplié par dix ou vingt [118, 10]. Ceci explique qu'on ait pu porter le diagnostic de la maladie de Waldenström dans un cas de trypanosomiase [39].

Outre l'appoint que cette découverte apporte au diagnostic de cette maladie, elle met en lumière un caractère biologique d'une grande importance théorique, car la β_2-macroglobuline fait partie du groupe des globulines immunitaires. L'hypothèse la plus naturelle est que la présence des trypanosomes dans l'organisme constitue une stimulation antigénique d'un type particulier, déclanchant la production d'anticorps spécifiques de type β_2-macroglobulinique, de façon prédominante sinon exclusive.

L'objet du travail rapporté ici est l'examen partiel de la validité de cette hypothèse. Il fallait disposer de techniques sérologiques nous permettant de mettre en évidence le pouvoir anticorps des sérums de trypanosomés. Ce point acquis, il fallait ensuite préparer, à partir de ces sérums, des fractions très purifiées d'immunoglobulines (et au minimum de γ-globulines et de β_2-macroglobulines) pour y chercher l'existence du pouvoir anticorps.

C'est à cette triple étude que nous nous sommes attachés. Après avoir rapidement passé en revue les notions établies sur la sérologie de la trypanosomiase et les préparations biochimiques des diverses immuno-globulines purifiées et leur rôle physiologique, nous donnerons les résultats de nos recherches personnelles, à savoir :

1. La mise au point de techniques de mise en évidence du pouvoir anticorps spécifique dans le sérum des sommeilleux. Nous avons particulièrement étudié l'inhibition de la respiration des trypanosomes (mesurée à l'appareil de Warburg) par le sérum des malades, et plus récemment, l'immuno-fluorescence des parasites;

2. La mise au point de méthodes de préparation d'immunoglobulines pures. Nous avons retenu en définitive des procédés nous permettant d'obtenir :

— des γ-pseudoglobulines (par fixation différentielle sur de la DEAE cellulose),

— des γ-euglobulines,

— des β_2-macroglobulines : ces deux fractions sont obtenues par filtration moléculaire sur gel de dextrane (Sephadex G 200).

Les difficultés techniques trop grandes de la préparation de β_{2A}-globulines sur de petits échantillons de sérum nous ont fait repousser cette étude à plus tard;

3. L'étude de l'action de ces fractions purifiées dans les tests sérologiques retenus.

PREMIÈRE PARTIE

RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE PREMIER

MÉTHODES DE MISE EN ÉVIDENCE DES ANTICORPS AU COURS DES TRYPANOSOMOSES

La récente thèse de J. Duret [41] contient une revue générale bien documentée sur cette question : nous ne répèterons pas cet excellent travail. Nous en avons repris les grandes lignes en précisant quelques points particuliers.

Les recherches sérologiques sur la trypanosomiase ont commencé à l'époque où est née l'immunologie, c'est-à-dire à la fin du XIX[e] siècle. En 1896, Rouget [150] démontra, en effet, que le sérum d'animaux infectés par *Trypanosoma equiperdum*, possédait des propriétés protectrices. Depuis, une très grande variété de recherches ont été entreprises. Les méthodes utilisées jusqu'en 1929 et leurs résultats ont fait l'objet d'une revue générale de Taliaferro [172].

Ces recherches ont eu trois buts principaux :

— la découverte de tests sérologiques permettant le diagnostic des diverses trypanosomoses humaines et animales,

— le classement par séro-typie des différentes espèces et variétés appartenant au genre *Trypanosoma*,

— la découverte d'une méthode de vaccination.

Dans ces pages nous nous intéresserons plus spécialement au premier de ces aspects.

Les méthodes sérologiques peuvent être commodément classées selon le type du phénomène immunitaire que l'on désire mettre en évidence. On peut avec Duret [41] faire un premier classement, selon qu'il s'agit d'une propriété se manifestant *in vivo* ou *in vitro*.

Méthodes sérologiques *in vivo*

Il s'agit essentiellement du pouvoir protecteur qui avait fait l'objet des premières observations de Rouget [150]. Ce pouvoir se recherche simplement en mettant en suspension une certaine quantité de trypanosomes virulents dans le sérum d'un animal ou d'un homme trypanosomé; on laisse quelque temps en contact et on inocule le tout à l'animal choisi. S'il existe un pouvoir protecteur, la maladie n'apparaît pas ou est d'évolution plus lente que chez les animaux témoins. Bon nombre de ces études sont dues à Laveran et Mesnil [104] et à Mesnil et ses collaborateurs [120, 121, 122]. Ces auteurs montrèrent que les anticorps obtenus sont assez spécifiques pour différencier *T. brucei* de *T. evansi*. Selon eux, les trypanosomes revêtus d'anticorps deviennent susceptibles d'être phagocytés.

Cette méthode est importante sur le plan théorique puisqu'elle concerne la qualité la plus importante du trypanosome : son pouvoir pathogène, mais elle est d'une application pratique difficile et n'a été que peu utilisée.

Soltys [161] reprit récemment cette étude et montra que, si le lapin fournit des anticorps neutralisants à des taux assez élevés (1/320), chez le cobaye le taux est déjà moins fort et ces anticorps sont inexistants chez le

rat et la souris. Ces anticorps seraient spécifiques et permettraient en particulier de mettre en évidence une différence antigénique complète entre *T. brucei* et *T. gambiense* et *rhodesiense.*

Cette méthode lui permit de poser un important problème : celui des modifications des trypanosomes en présence d'anticorps, modifications qui les rend insensibles à l'action de ces mêmes anticorps. Soltys a constaté que les sérums des lapins servant à entretenir par passage une souche de *T. brucei*, ne neutralisent plus les trypanosomes des souches homologues ou hétérologues mais continuent de neutraliser la souche originelle.

Des faits semblables ont été rapportés par Vaucel et Fromentin [184]. Cette méthode n'a pas d'application au diagnostic pratique de la trypanosomiase humaine.

Méthodes sérologiques *in vitro*

Trypanolyse

C'est Schilling [155] qui, en 1902, observa le premier le phénomène de lyse des trypanosomes par le sérum d'un taureau immunisé contre le nagana. Plusieurs auteurs confirmèrent cette découverte sur d'autres cas. Massaglia [112] expliqua les crises trypanolytiques observées au cours de diverses trypanosomoses par l'action de ces anticorps. Levaditi et Mutermilch [106] montrèrent que le complément est nécessaire pour que la lyse s'opère. Cette réaction n'a pas eu d'applications diagnostiques, car ses résultats sont irréguliers.

Inhibition de la consommation d'oxygène des trypanosomes

Selon Desowitz [28, 30] les mêmes trypanolysines

sont responsables de troubles métaboliques chez le micro-organisme que l'on peut mettre en évidence en mesurant à l'appareil de Warburg la respiration d'une suspension de trypanosomes en présence de sérum de malade : celle-ci est considérablement inférieure à celle que l'on mesure en présence de sérum normal. Cette réaction n'a fait l'objet que d'un petit nombre d'applications à l'homme, car selon Desowitz [29, 31], la présence d'un pouvoir trypanolytique du sérum humain normal, gêne la réaction. Ce pouvoir n'existerait pas chez de nombreux animaux; aussi cette méthode a-t-elle été surtout appliquée à la pathologie vétérinaire. Selon Thurston [179] il s'agit d'une méthode peu sensible. Elle possède toutefois l'avantage de mesurer l'effet des anticorps sur les trypanosomes vivants, dans des conditions apparentées aux conditions biologiques.

Agglutination

Il s'agit ici encore d'observations anciennes puisque c'est en 1900 que Laveran et Mesnil [103] constatèrent que le sérum d'animaux infestés par *T. lewisi* était capable d'agglutiner ces micro-organismes, sans toutefois les immobiliser préalablement.

De nombreux essais d'application de cette réaction au diagnostic des trypanosomoses furent entrepris et dans l'ensemble leur résultat fut négatif peut-être en partie par suite d'une technique insuffisante (par exemple il semble que l'emploi de suspensions de trypanosomes tués conduise à de mauvais résultats).

Fromentin [59], à la suite d'une infection accidentelle par *T. gambiense*, n'obtint d'agglutination qu'avec la souche infestante. Cette réaction serait donc particulièrement adaptée à la mise en évidence de variétés antigéniques d'une même espèce. Vaucel et Fromentin [184] montrent que les différences antigéniques d'une

souche à une autre (ou plus exactement aux lignées de rechute de cette même souche) sont nettes à l'aide de cette réaction pratiquée sur le sérum de cobaye infecté par *T. gambiense*. Si, toutefois, la maladie se prolonge, la spécificité devient de moins en moins étroite et s'étend à l'espèce entière. La réaction est négative avec *T. equiperdum* et *T. brucei*.

Soltys [162] avait réétudié en 1957 cette technique et fait les mêmes conclusions : les trypanosomes d'une même espèce, quel qu'en soit la souche, présentent une étroite parenté antigénique. Au contraire, il n'existe pas de réaction croisée d'une espèce à l'autre.

Cette réaction a été appliquée au diagnostic de la trypanosomiase à *T. rhodesiense* [162] et à l'analyse antigénique des trypanosomes. Inoki [86, 87, 88] pratique l'agglutination des trypanosomes sur lame et étudie la souche de rechute apparaissant chez une souris infestée par *T. gambiense* lorsqu'on la traite incomplètement par du sérum humain. Cette souche possède une spécificité immunologique propre. Mais si l'on provoque une nouvelle fois l'apparition d'une souche de rechute, il y a toujours retour au type antigénique initial.

Cunningham et Vickermann [25] se sont intéressés à l'analyse antigénique de souches de *T. brucei*. Ces auteurs démontrent l'existence de six antigènes différents. Dans une souche donnée, on peut identifier de un à cinq d'entre eux. Il existe des antigènes communs d'une souche à l'autre et d'une souche à la souche de rechute correspondante. Si l'on part d'un clone on ne trouve qu'un seul antigène pour la souche.

Duret [41] a précisé les conditions techniques de cette réaction et a confirmé sa spécificité. Elle a pu montrer l'apparition d'anticorps agglutinants de titre élevé (de l'ordre du 1/1000) chez le lapin infesté par *T. équiperdum*. Au contraire, les taux sont beaucoup plus fai-

bles lorsque l'animal est inoculé avec *T. gambiense*. En saturant le sérum immun avec des trypanosomes vivants, on fait disparaître les anticorps agglutinants. Pourtant la réaction de fixation du complément se fait au même taux qu'avant, ce qui semble indiquer l'existence de deux espèces différentes d'anticorps.

Selon Duret, l'anticorps agglutinant correspond à des motifs antigéniques périphériques, responsables de la spécificité du trypanosome. Weitz [189, 190] pense que les antigènes trypanosomiens que l'on peut trouver dans le sérum des animaux infectés (exo-antigènes solubles) sont aussi en rapport avec la réaction d'agglutination. Pautrizel et ses collaborateurs [130] reprenant l'étude de cette réaction, établissent des conclusions très différentes de celles de Soltys. Selon leur expérience, la réaction doit être conduite en travaillant sur une série de dilutions du sérum car un phénomène de zone est fréquent. D'autre part, et c'est le fait majeur, la spécificité de la réaction leur paraît très étroite. Il n'y a pas de réaction croisée, non seulement d'une espèce à l'autre, mais encore d'une souche à l'autre. Dans ces conditions la réaction est inapplicable au diagnostic sérologique de la trypanosomiase.

Adhérence des trypanosomes

Une série de réactions sérologiques, dont le mécanisme est assez mal élucidé, utilisent comme phénomène observable l'adhérence des trypanosomes à divers particules ou éléments figurés. Il s'agit avec Rieckenberg [146] de l'adhérence aux plaquettes en présence d'un sérum immun. Avec Duke et Wallace [40], c'est sur les hématies que se fixent les trypanosomes au cours d'une réaction apparentée au phénomène d'immun adhérence des tréponèmes décrit par Nelson.

Ces techniques ont été utilisées pour le diagnostic de

la trypanosomiase humaine. Leur réalisation technique est délicate et ceci a certainement limité leur application.

Fixation du complément

Cette réaction se pratique sous deux variantes majeures. Si l'on se sert du système usuel (hématies de mouton, sérum anti-hématies de mouton, complément de cobaye) le phénomène observé est une hémolyse. Si l'on utilise un système différent comportant les mêmes hématies de mouton, du sérum de bœuf inactivé contenant des anticorps naturels incomplets anti-hématies de mouton et la conglutinine, enfin un complément non hémolytique apporté par le sérum frais de cheval, le phénomène observé est une hémagglutination, dite ici « conglutination ».

Fixation du complément hémolytique.

Levaditi et Mutermilch [106] furent les premiers à appliquer avec quelques succès cette réaction au cas de la trypanosomiase. Toutefois son emploi restait limité par l'inconstance de la spécificité de la réaction et surtout le fort pouvoir anticomplémentaire des antigènes utilisés.

Des améliorations portant sur la technique de préparation de l'antigène (à partir de *T. equiperdum*) permirent à Schoenaers, Neujean et Evens [156] d'obtenir des résultats plus consistants. Cette technique fut considérée par Depoux, Merveille et Ceccaldi [27] comme un moyen de suivre l'évolution de la maladie du sommeil. Neujean et Evens [123] considèrent que la réaction ne donne de fausses négativités que dans 5 % des cas. Les fausses positivités sont très rares. A la suite d'inoculations expérimentales de l'homme, ils ont constaté que la réaction est positive entre le septième et le

quinzième jour et devient maximum une semaine plus tard. Le traitement négative la réaction en 12 à 18 mois. L'anticorps ne se trouve pas dans le liquide céphalo-rachidien.

La réaction fut encore améliorée par Pautrizel et coll. [131, 132] qui augmentèrent la pureté de l'antigène préparé à partir de *T. equiperdum*. La spécificité du test paraît excellente puisque sur 39 malades, les auteurs obtinrent 39 réactions positives et qu'il n'y eut aucune fausse positivité enregistrée sur 104 sérums normaux et pathologiques. L'inconvénient de la méthode est que pour 13 sérums de trypanosomés la réaction ne put être interprétée car ces sérums étaient anti-complémentaires. Cette réaction paraît une des plus utilisable pour le diagnostic de laboratoire de la maladie du sommeil.

Immuno-conglutination.

Cette réaction a été appliquée au diagnostic de la trypanosomiase par deux groupes de chercheurs Ingram et Soltys [85] d'une part et Pautrizel et ses collaborateurs de l'autre [130, 41]. Les premiers se sont attachés à l'étude du sérum de lapins et de chats inoculés avec *T. brucei*. L'anticorps fixant le complément apparaît et atteint son maximum plus ou moins rapidement selon le milieu de la souche utilisée. Il est décelable en une semaine ou moins et est à son maximum en trente jours pour la souche la moins virulente et dix à quatorze jours pour la souche la plus agressive. Cet anticorps apparaît avant l'anticorps neutralisant. De même sous l'effet du traitement, son taux décroît alors que celui de l'anticorps neutralisant reste pratiquement inchangé.

Pautrizel et ses collaborateurs ont appliqué cette réaction à la trypanosomiase expérimentale du lapin

[41] et à la maladie humaine [130]. Dans le premier cas, les résultats sont identiques à ceux que l'on obtient avec la technique hémolytique classique, mais l'immuno-conglutination paraît être une méthode plus sensible quoique d'exécution plus difficile.

Appliquée à l'affection humaine, cette réaction s'est montrée également plus sensible que la fixation du complément hémolytique classique, quoique tout aussi spécifique. Sa sensibilité au phénomène de zone et les difficultés qu'entraînent la faible affinité du complexe antigène-anticorps antitrypanosomes à l'égard du complément de cheval en rendent la pratique délicate.

Réaction de précipitation

W. Taliaferro et L. Taliaferro [174] furent les premiers en 1934 à mettre en évidence l'existence d'anticorps précipitants dans le sang de chevaux infectés par *T. hippicum* et *T. equiperdum*. Ces auteurs ont utilisé la technique classique de l'anneau qui consiste à observer la précipitation antigène-anticorps à l'interface d'une couche d'antisérum et d'une couche de solution antigénique. L'antigène était ici constitué par une suspension de trypanosomes tués, formolés et conservés en solution glycérolée. Cette réaction permet d'observer la formation de précipités spécifiques.

En 1960, Weitz [189] montra que *T. brucei* libère un antigène soluble (exo-antigène) qui paraît être identique à l'antigène de surface responsable du phénomène d'agglutination. Cet antigène se retrouve dans le sang du rat infecté par *T. brucei* et l'on peut, en injectant le sérum d'un tel animal à un autre rat, lui faire développer des anticorps précipitant l'exo-antigène. Weitz a pu mettre en évidence un trait de précipitation net par analyse immuno-électrophorétique de sérum de rat infecté,

révélé par l'antisérum de rat. Vraisemblablement cet antigène soluble n'est pas de nature protéique : ce serait un glucide.

Gray [68] a confirmé et étendu les observations de Weitz au cas d'autres trypanosomes (*T. vivax* et *T. gambiense*). Il utilise la technique de double diffusion en gélose. Il montre que les sangs de rats expérimentalement infectés par *T. vivax*, *T. gambiense* ou *T. brucei* ou de chèvres infectées par *T. vivax*, contiennent des anticorps dirigés contre les antigènes solubles, libérés par ces trypanosomes. Cette étude révèle qu'il existe plusieurs antigènes solubles pour une même souche et que deux de ces antigènes sont communs à *T. vivax* et à *T. brucei* et *T. gambiense*. On met en évidence à la fois une spécificité d'espèce assez large et une spécificité de souche très étroite, au niveau de ces antigènes de surface. Selon Gray [67, 69] il est possible de faire apparaître des précipitations en gélose par la technique d'Ouchterlony par l'interaction d'un antigène trypanosomien et de sérum de sommeilleux. Les essais entrepris à Bobo-Dioulasso [11] et à Dakar n'ont toutefois jamais permis de répéter ces expériences avec le sérum humain.

Hémagglutination passive

Cette réaction consiste à fixer par un procédé chimique l'antigène sur des hématies et à étudier l'agglutinabilité de ces hématies sensibilisées par l'anticorps correspondant. Les polyosides peuvent se fixer spontanément sur la surface de l'hématie. Cette méthode a été appliquée aux trypanosomoses par Bouisset et ses collaborateurs [15], Lee-Jones [105] et Dodin et Fromentin [38]. Bouisset a immunisé des lapins à l'aide d'un antigène lyophilisé à base de *T. cruzi*. Il a, d'autre part, infesté d'autres lapins avec *T. equiperdum*. Les sérums de ces animaux agglutinaient les hématies tannées, revê-

tues d'antigène extrait de *T. cruzi* à des taux allant du 1/4 au 1/64e.

Lee-Jones a indiqué dans une brève note que l'exo-antigène pouvait être absorbé sur les hématies tannées et ces hématies agglutinées par les antisérums correspondants.

Dodin et Fromentin ont choisi pour antigène les substances solubles que les trypanosomes de culture laissent diffuser dans le milieu. Ces antigènes peuvent être fixés directement par les hématies sans qu'il soit nécessaire de les tanner. Ils ont alors étudié l'agglutination de ces hématies par des dilutions de sérums de malades. Sur 28 sujets trypanosomés, ils ont obtenu des résultats positifs chez 21 (taux supérieurs au égaux au 1/40). Les sept autres étaient négatifs à la dilution du 1/10. Chez 27 sommeilleux traités, onze ont encore des anticorps hémagglutinants. Les témoins ont été négatifs.

Selon ces auteurs, cette réaction paraît intéressante mais doit faire encore l'objet d'études avant que l'on puisse apprécier sa valeur.

CHAPITRE 2

LES DIVERS TYPES DE GLOBULINES IMMUNITAIRES

La technique d'électrophorèse des protéines, introduite par TISELIUS, a démontré la complexité de la fraction globulinique du sérum. Trois groupes furent définis sous les noms d'α, β et γ-globulines, le dernier comprenant les protéines possédant la mobilité la plus lente à un pH alcalin. Un des plus anciens et sans doute un des plus fructueux résultats de cette technique fut la découverte en 1939, par TISELIUS et KABAT [180], que les anticorps précipitants appartiennent à ce groupe des γ-globulines. Vers la même époque, PEDERSEN [76, 133] remarqua grâce à l'ultracentrifugation que les anticorps sédimentent avec des vitesses inégales sous l'influence de la force centrifuge, ce qui reflète la disparité de leur masse particulaire. Toutefois, l'étude approfondie des plus lourds d'entre eux, dits macroglobuliniques, ne s'est développée que récemment. La description clinique de la maladie de Waldenström et l'isolement des macroglobulines pathologiques, trouvées au cours de cette affection [185], ont stimulé considérablement les recherches sur les macroglobulines en général.

L'application du procédé d'analyse immuno-électrophorétique à l'étude des protéines sériques [132, 133,

134] devait clairement montrer la complexité des γ-globulines au sens électrophorétiques du terme. Très vite il apparut qu'une nouvelle protéine, la β_{2A}-globuline, devait être rattachée à ce groupe. Son isolement par HEREMANS [78] permettait bientôt de confirmer sa place parmi les molécules détentrices d'un pouvoir anticorps.

Il existe donc un groupe de protéines immunitaires au niveau des protéines les plus basiques du sérum humain. L'analyse immuno-électrophorétique permet de les décrire comme constituées d'au moins trois protéines : les γ-globulines (ou selon la nomenclature commode due à Waldenström, les γss, c'est-à-dire *sensu stricto*) dont la mobilité électrophorétique est très disparate (allant de la zone α_2 à la zone γ) mais qui possèdent en commun une même structure antigénique ; les β_2-macroglobulines et la β_{2A}-globuline localisées dans une région plus limitée du spectre électrophorétique (dénommées dans la nomenclature de HEREMANS γ_1M et γ_1A-globulines). Toutefois, il est clair que ces dernières protéines s'étagent toutes deux sur une gamme de mobilité, mais beaucoup plus étroite que celle des γ-globulines.

Normalement le taux des γ-globulines est de beaucoup supérieur à celui des β_2-macroglobulines et de la β_{2A}-globuline. Il y a approximativement entre 12 et 15 mg de γ-globulines par ml de plasma, tandis que la teneur en β_{2A} serait de 1,1 mg et celle de β_2-macroglobuline de 0,75 mg [78] ; mais on sait bien en physiologie, que des activités intenses sont parfois dues à des composés peu abondants.

Puisque les anticorps ont été retrouvés dans l'une ou l'autre de ces fractions, on peut se demander s'il existe une sélection naturelle du type d'anticorps produit, en réponse à une stimulation antigénique particulière. Les trois types d'anticorps sont-ils simultanément produits ? Ou bien se fait-il une biosynthèse préférentielle d'un ou

deux types ? Si tel est le cas, quels sont les facteurs déterminant ce choix ? A priori, on peut envisager l'étude des facteurs suivants :

— nature chimique de l'antigène,
— mode d'administration de cet antigène (lieu et doses),
— durée de l'immunisation,
— caractères de l'organisme immunisé — espèce animale, âge, état physiologique,
— organe, tissu ou système producteur d'anticorps.

La découverte faite en 1937 par HEIDELBERGER et PEDERSEN [76], montrant que certains anticorps antipneumococciques sédimentent plus rapidement à l'ultracentrifugation que les anticorps examinés jusqu'alors, ne paraît pas avoir eu le retentissement immédiat qu'elle méritait. En dehors de quelques travaux isolés, on peut considérer que l'étude des divers points indiqués plus haut, n'a commencé d'être faite de façon systématique que dix ans plus tard, à l'aide de méthodes variées.

Les techniques utilisées pour ces études ont été les suivantes :

— Etudes des modifications des taux des trois immuno-globulines au cours de diverses affections.

— Préparation de fractions chimiques purifiées de γ, de β_2M ou de β_2A-globulines, suivie de la recherche du pouvoir anticorps sur ces fractions isolées. Une technique apparentée consiste à travailler sur des fractions enrichies en un constituant donné.

— Préparation d'anticorps purs par dissociation du complexe antigène/anticorps et identification immunochimique du type de protéines libérées à partir de ce complexe.

— Etudes indirectes utilisant des sérums antiglobu-

lines, comme il est classique dans les procédés de groupage sanguin. La seule différence est que les sérums antiglobulines ont ici une spécificité rigoureuse anti-β_{2A}, anti-β_{2M} ou anti-γ-globuline. La même technique est applicable après marquage des anticorps par des substances fluorescentes.

— Action des réducteurs à fonction thiol entraînant une dépolymérisation des β_2-macroglobulines [35, 36] et en conséquence une perte du pouvoir anticorps [34].

Le bilan de ces recherches ne permet pas encore de conclusions simples. Nous l'exposerons en considérant que dans le cas le plus général, les anticorps sont des γ-globulines au sens immunologique du terme (γss). Nous ferons donc ressortir les cas où les anticorps sont d'une nature différente : β_2-macroglobuline ou β_{2A}-globuline.

Nous avons préféré présenter ces résultats en fonction de l'espèce animale étudiée et ensuite seulement de l'antigène considéré.

Cheval. — C'est le sérum de cheval qui servit lors de première mise en évidence du haut-poids moléculaire des anticorps agglutinants anti-pneumococciques [76, 90, 92]. Les travaux de Van der Scheer et coll. [183] entrepris à la même époque confirment ce point. Ceci correspond bien aux observations faites par Felton [48] sur les chevaux immunisés par voie veineuse avec des bactéries. Cet auteur avait remarqué que les agglutinines obtenues sont généralement des euglobulines qui précipitent à des pH plus alcalins que les euglobulines usuelles du sérum de cheval normal. Ces travaux ont été confirmés par Sandor [151, 152, 153]). Cet auteur prépare un précipité d'euglobulines à pH = 8 et faible force ionique (qu'il nomme « Euglobuline I »). Ce précipité contient chez le cheval normal environ 80 % de macroglobulines (19S) et 20 % de globulines (environ 6S).

Chez l'animal, ayant subi des injections intraveineuses de méningocoques, le taux de l'Euglobuline I totale augmente beaucoup, mais elle ne comprend plus que 25 % de macroglobulines. Le reste est formé par une globuline de constante de sédimentation 5,5S. Comme cette globuline est, de façon inattendue, parfaitement homogène sous l'angle immuno-chimique avec la macroglobuline, SANDOR pense qu'il s'agit d'un monomère de la macroglobuline, malgré une teneur assez différente en hexoses (moins de 1 % pour le monomère, plus de 5 % pour la macroglobuline). Il ne s'agirait pas d'un produit de dissociation de la macroglobuline (à l'instar de ce que permet d'obtenir le mercapto-éthanol ou d'autres composés à fonction thiol).

L'Euglobuline I totale paraît en majeure partie, sinon en totalité, composée d'anticorps agglutinants. Ce monomère de la macroglobuline possèderait donc le pouvoir anticorps.

Les travaux sur le cheval sont donc peu nombreux mais ont abouti à des conclusions particulièrement stimulantes pour la recherche.

Bœuf et Porc. — HEIDELBERGER et KABAT [76] purent étendre les premières observations faites sur le sérum antipneumococcique de cheval au cas du bœuf et du porc : il s'agit là encore d'anticorps macroglobuliniques.

Lapin. — C'est l'animal de choix des immunologistes et il n'est pas étonnant que le problème de la nature chimique de ses anticorps ait été particulièrement étudié. PAIC [128] montra, dès 1939, grâce à l'ultracentrifugation, que les hémolysines obtenues par injection d'hématies de mouton au lapin, sont de nature macromoléculaire.

En 1956, Talmage, Freter et Taliaferro [176, 177] utilisant aussi l'ultracentrifugation, confirment ce rapport. Ils montrent toutefois qu'il existe aussi des anticorps de poids moléculaire plus léger. L'anticorps « lourd » et l'anticorps « léger » ont des propriétés biologiques quelque peu différentes. Ces auteurs ont mesuré par une technique originale leur capacité de combinaison à l'antigène et, d'autre part, leur activité hémolytique. Le rapport de ces deux activités n'est pas le même pour les deux types d'anticorps : l'anticorps macroglobulinique est relativement plus fortement hémolytique puisque le rapport activité hémolytique/pouvoir de combinaison est 10 fois et dans certains cas jusqu'à 100 fois plus élevé pour lui que pour l'anticorps « léger ». Ceci est vrai tant pour l'anticorps isophile que pour l'anticorps de Forsmann obtenu par chauffage de l'antigène avant l'injection. Stelos et Talmage [165, 168] montrent que ces deux types d'anticorps ont des mobilités électro-phorétiques différentes. L'anticorps lourd migre comme une β_2-globuline, tandis que l'anticorps léger se comporte comme une γ-globuline. Ces anticorps diffèrent également métaboliquement : la vitesse de disparition de l'anticorps macroglobulinique est beaucoup plus rapide. Taliaferro et Talmage [175] ont calculé que sa demi-vie est de 2,8 jours, tandis qu'elle est du double pour l'anticorps de petit poids moléculaire : 5,55 jours. D'autre part. Weinrach et Talmage [188] ont montré que la cinétique de l'hémolyse n'était pas la même pour les deux types d'anticorps.

Johnson, Woernley et Presmann [89] ont confirmé l'essentiel des résultats de Paic et de Taliaferro et Talmage. Ils ont, en effet, vérifié que c'est bien au niveau des globulines sédimentant rapidement (avec une constante de 19S) que se retrouve l'activité hémolytique d'un antisérum obtenu par administration au lapin d'hé-

maties de mouton, au rythme de 9 injections en 3 semaines. Ils constatent en revanche que si l'animal est immunisé avec des globules rouges humains de groupe O Rh + les hémolysines se trouvent dans une zone correspondant à des molécules plus légères de constante de sédimentation 6,95S.

Stelos [166] montra, en 1958, qu'à cet égard les hématies de bœuf provoquent, comme celles du mouton, l'apparition des deux types d'anticorps. En outre, ce travail lui permit de faire une remarque importante : dans les sérums prélevés au début de l'immunisation (c'est-à-dire à la deuxième semaine), l'hémolysine est de nature macroglobulinique exclusivement. Le prélèvement fait à la troisième semaine montre la coexistence d'anticorps lourds et légers. A la huitième semaine, ces derniers sont devenus prédominants.

Il faut signaler que Porter en 1955 [141] avait remarqué des différences du comportement chromatographique des anticorps (par chromatographie de partage sur colonnes de Célite) selon qu'on se trouvait en début d'immunisation ou plus tard.

Stelos et Taliaferro [167] étudient à nouveau ce point à l'occasion d'une étude sur les anticorps anti-substances de Forsmann (capables de lyser les hématies de mouton en présence de complément). Ces antisérums sont obtenus par injection d'antigène de Forsmann de diverses origines : globules rouges de mouton, reins de cobaye, hématies humaines du groupe A. Les immunsérums prélevés précocément, contiennent des anticorps sédimentant rapidement à l'ultracentrifugation; prélevés plus tardivement, ils recèlent en outre des anticorps moins denses. Toutefois, l'anticorps anti-hématies humaines A demeure uniquement macroglobulinique. De plus, ces auteurs montrent que le mercapto-éthanol, connu pour son pouvoir de dépolymériser les macroglobulines

en détruisant leur pouvoir anticorps [34], inhibe dans ce cas l'hémolyse des globules rouges de mouton.

Plus récemment, Pike et Schulze [138] ont repris ces expériences en séparant les types d'anticorps produits, non seulement par ultracentrifugation, mais aussi par chromatographie sur colonne de DEAE cellulose. Ils préparent des immun-sérums contre les hématies de mouton, de bœuf et d'homme de groupe O Rh +. Ils montrent que la répartition chromatographique du pouvoir anticorps se fait différemment au début et à la fin de l'immunisation. Les résultats de ces expériences confirment les traits essentiels des observations faites par ultracentrifugation : le pouvoir anticorps précoce se situe dans les fractions riches en macroglobulines et se déplace ensuite au niveau des γ-globulines.

Ces auteurs recherchent également une différence qualitative de l'activité biologique des deux types d'anticorps et pour ce faire, utilisent deux tests : l'hémolyse qui s'opère en présence de complément et l'agglutination, en son absence. Le rapport pouvoir hémolytique/pouvoir agglutinant est plus élevé pour les anticorps macroglobuliniques : ce qui s'accorde avec les conclusions de Talmage et coll. [176, 177].

L'activité hémolytique des sérums anti-hématies humaines O est très basse, ce qui serait lié à la faiblesse de la synthèse d'anticorps macroglobulinique dans ce cas. Ce point confirme les conclusions de Johnson et coll. [89].

D'autres caractères biologiques des anticorps lourds ont été établis par Goodman [63] qui constate qu'à activité hémolytique égale, l'anticorps lourd fixe moins de complément que l'anticorps léger.

Goodman et Masaïtis [65] trouvent que les anticorps macroglobuliniques se laissent moins facilement dissocier de l'antigène que les anticorps de type normal.

Bauer et Stavitsky [8] ont raporté d'intéressantes recherches effectuées en partie à l'aide d'antigènes cellulaires administrés en une seule injection. Ils confirment les résultats obtenus par les chercheurs de l'école de Taliaferro sur les hématies de mouton. Onze jours après l'injection on ne trouve que des anticorps lourds. Plus tard, ce type d'anticorps a tendance à faire place à un anticorps γ-globulinique léger. Il en est de même lorsqu'on teste les anticorps anti-H obtenus par injection de bacilles typhiques à l'animal. En revanche les anticorps anti O, sont toujours de nature macroglobulinique et le demeurent exclusivement. Grubb et Swahn [70] ont constaté que le mercapto-éthanol, qui possède la propriété d'inactiver les macroglobulines, diminue de moitié le titre des anticorps anti-typhiques alors qu'il laisse intact celui des anticorps anti-pneumococciques.

Ces auteurs, ainsi que Benedict et coll. [9] se sont également intéressés à la production d'anticorps non cellulaires. Bauer et Stavitsky ont injecté à des lapins de la γ-globuline bovine, de la sérum albumine humaine, de l'hémocyanine, de l'anatoxine diphtérique, du bactériophage T_2, de l'amylase de *B. subtilis*. Les anticorps anti-protéiques obtenus par une injection antigénique isolée, suivent les mêmes règles d'apparition que les anticorps suscités par les antigènes cellulaires : après cinq jours, il s'agit avant tout de macro-globulines; après huit jours, il existe un peu de γ-globulines 7S et après trente jours, les anticorps sont des γ_2-globulines légères exclusivement.

Les anticorps lourds ont les propriétés suivantes : ils peuvent agir comme précipitines, leur action est plus énergique à 5°C qu'à 37°C; leur activité est influencée par le stockage au froid. Pour l'antitoxine diphtérique, le pouvoir antitoxique se conserve bien, mais l'activité

hémagglutinante décroît vite. Le pouvoir anticorps est détruit par action du mercapto-éthanol.

Benedict et ses collaborateurs travaillent avec l'albumine bovine comme antigène. Ils confirment bien la synthèse précoce de macroglobulines anticorps, s'effaçant pour laisser la place aux γ-globulines légères. Les anticorps lourds auraient un faible pouvoir précipitant et une capacité de combinaison à l'antigène moindre, leur activité ne serait pas meilleure à basse température. Ces conclusions s'écartent quelque peu des données des auteurs précédents.

Ayant mis l'accent sur les anticorps macroglobuliniques, il faut pour être complet, signaler que certains antigènes paraissent donner lieu chez le lapin à la formation rapide d'anticorps γ-globuliniques légers. Si le sérum anti-pneumococcique de cheval se caractérise par la nature macroglobulinique de ses anticorps, ceux du sérum de lapin ont un poids moléculaire d'environ 157 000 selon les travaux d'Heidelberger, de Pedersen, d'Askonas et coll. [76, 133, 5].

Signalons enfin, que le poids moléculaire de l'anticorps anti-acide azophénylarsonique a été mesuré : il est de l'ordre de 150 000 [20, 42].

Cobaye. — Selon Uhr (cité par Franklin [57]), la réponse immunitaire précoce du cobaye serait, comme chez le lapin, de nature macroglobulinique.

Souris. — Fahey et Humphrey [45] ont injecté par voie intraveineuse une dose antigénique unique à des souris C_3H. Le sang de ces animaux est prélevé six jours après l'injection. On étudie la répartition des anticorps dans les fractions obtenues, soit par ultra-centrifugation, soit par chromatographie sur DEAE-cellulose.

Injectée avec du polysaccharide pneumococcique SSS III, la souris répond comme le lapin, par la produc-

tion d'anticorps (observés par hémagglutination passive) de nature γss et non macroglobulinique comme le cheval. L'hémocyanine provoque l'apparition de précipitines de même nature. En revanche, les anticorps hémolysant, résultant de l'administration de globules rouges de mouton, sont avant tout macroglobuliniques, avec toutefois une faible proportion de γss globulines.

Rat. — Cet animal n'a été à notre connaissance, utilisé dans ce type d'investigation, qu'à une seule occasion, à la vérité d'un intérêt tout particulier pour notre recherche. D'Alesandro [4] a, en effet, étudié la nature des anticorps élaborés par le rat au cours d'une infestation expérimentale à *Trypanosoma lewisi.* Ce parasite a fait l'objet de nombreuses recherches immunologiques en raison de la nature très particulière de la réponse immunitaire qu'il engendre chez l'hôte. Les parasites apparaissent dans le sang dès le lendemain de l'inoculation et ils s'y multiplient rapidement. Vers le cinquième ou sixième jour, une crise survient et le nombre des parasites décroît fortement. Les parasites survivants demeurent dans le sang pendant trois à quatre semaines ou davantage. Ensuite survient une nouvelle crise qui signe la fin de l'affection. Il faut de plus remarquer qu'au cours de la première période, l'activité reproductrice des trypanosomes va en déclinant. Alors qu'au début les parasites sont de forme et de taille variable, ils deviennent peu avant la première crise, extrêmement uniformes.

Une interprétation courante de ces faits est que le rat élabore trois types d'anticorps contre ce trypanosome :

— un anticorps inhibiteur de la reproduction [171], dénommé ablastine par Taliaferro [173],

— un anticorps trypanocide responsable de la première crise trypanolytique,

— un autre anticorps trypanocide à l'origine de la crise terminale; la présence de ces deux anticorps a été invoquée par Coventry [24], mais la réalité de la pluralité de ces anticorps a été contestée par certains auteurs.

D'Alesandro a tenté d'isoler ces anticorps par électrophorèse sur amidon et ultracentrifugation préparative. Il a montré que l'activité ablastique et l'anticorps déterminant la première crise, se localisent électrophorétiquement dans la zone des β-globulines lentes; ils migrent à l'ultracentrifugation avec une constante de sédimentation de 6S. D'Alesandro pense qu'il ne faut pas tirer de cette localisation commune la conclusion qu'il s'agit d'un seul et même anticorps. Au contraire, l'anticorps responsable de la crise terminale est de nature macroglobulinique : il migre avec les β-globulines lentes et possède une constante de sédimentation de 16S.

Singe. — Les travaux de Tiselius, Kabat, Pedersen [180, 92, 133] ont montré que les anticorps anti-pneumococciques de singe, étaient localisés comme ceux de l'homme ou du lapin, dans la fraction γ-globulinique sédimentant le plus lentement à l'ultracentrifugation.

Homme. — L'existence des macroglobulines fut mise en évidence grâce à l'ultracentrifugation, et, en 1945, Pedersen constata que les iso-agglutinines contenues dans le sérum humain, pouvaient appartenir à cette classe de protéines de constante de sédimentation 20S [133].

Anticorps anti-éléments figurés du sang

Cette découverte fut confirmée par Deutsch et ses collaborateurs [32, 33] qui fractionnèrent du plasma humain par l'alcool. L'activité hémagglutinante se trouvait principalement localisée dans une des fractions.

L'étude électrophorétique de cette fraction montra qu'elle migrait comme une γ_1-globuline et à l'ultracentrifugation, possédait une constante de sédimentation de 18S, ce qui aux erreurs d'expérience près, est conforme aux données de PEDERSEN.

En 1950, WURMSER et ses collaborateurs remarquèrent des différences dans les modalités énergétiques de la réaction : agglutinines anti-B-hématies du groupe B, selon l'origine de ces agglutinines : sujets de groupe (A, O), (OO) ou (A, A). Ils ont cherché à savoir si le poids moléculaire de ces divers types était identique [50]. Ils déterminent par l'ultracentrifugation les constantes de sédimentation suivantes pour ces agglutinines :

Sujet A, A : $S_{20} = 11$
A, O : $S_{20} = 15{,}5$
OO : $S_{20} = 6{,}5$

Ils en déduisent des poids moléculaires respectifs de 300 000, 500 000 et 170 000. Ces constantes de sédimentation paraissent dans l'ensemble inférieures à celles indiquées par la majorité des auteurs, mais ont été retrouvées dans les récents travaux de ROCKEY et KUNKEL [148].

En 1958, MC DUFFIE et ses collaborateurs [110] purent prouver que dans les précipités spécifiques agglutinines anti-A/substance de groupe A, on rencontre trois types d'anticorps. Deux d'entre eux purent être identifiés : il s'agit de γ-globulines proprement dites et de γ-globulines lourdes.

A la même époque DEUTSCH et CHAN [34] montrent que le mercapto-éthanol diminue fortement ou annule l'activité anti-A ou anti-B des sérums. Ce résultat a été confirmé depuis par GRUBB et SWAHN [70]. Ceci indiquerait que tout ou une partie de l'anticorps est de nature macroglobulinique.

Cette étude fut reprise par Fudenberg et Kunkel [61] à l'aide d'une technique améliorée pour la préparation des macroglobulines, à savoir : l'ultracentrifugation sur gradient de densité. Ils montrent aussi que la répartition de l'activité anti-A est variable selon les sujets. Certains ont leurs anticorps naturels exclusivement de nature macroglobulinique; d'autres seulement sous forme d'anticorps légers. On trouve enfin, des sujets chez lesquels les anticorps sont constitués d'un mélange de globulines 7S et 19S. Il semble que le type le plus rare soit celui où les iso-agglutinines appartiennent à la classe 7S [98].

Récemment, ayant encore perfectionné leur technique d'ultracentrifugation, Rockey et Kunkel [148] parviennent à la conclusion qu'en plus des anticorps 19S et 7S dont l'existence est bien établie, certains sérums présentent des anticorps de constante de sédimentation intermédiaire de l'ordre de 9 à 15S. Sans doute, avec les techniques utilisées jusqu'ici, ces anticorps étaient confondus avec les macroglobulines. Ces substances sont inactivées par le mercapto-éthanol. Il s'agit peut-être de β_{2A}-globuline.

L'apparition des méthodes de fractionnement sur celluloses modifiées permit leur application à de nouvelles études sur la localisation de l'activité hémagglutinante. Abelson et Rawson [1, 2] montrèrent que par chromatographie sur DEAE et CM cellulose, il était possible de séparer les iso-hémagglutinines anti-A et anti-B en trois groupes. Le premier est constitué de γ_2-globuline de constante de sédimentation 7S, le second de protéines hétérogènes quant à leur mobilité électrophorétique. Le troisième contient des protéines qui migrent comme des γ-globulines, mais dont les constantes de sédimentation sont variables : 3,5S; 7S; 19S; 31S. Poursuivant ce travail, les mêmes auteurs [144, 145] montrent que les

iso-hémagglutinines lourdes sont particulièrement actives en milieu salé, tandis que les constituants 7S ont une activité maximale en présence de sérum antiglobuline. Ces auteurs [145] ont encore constaté que chez les sujets de groupe O, les iso-hémagglutinines se trouvent de façon prédominante parmi les molécules de constante de sédimentation 7S, tandis que chez les sujets de groupe A ou B, il s'agit surtout de globulines lourdes 19S.

Speer et coll. [163] ont également fractionné des sérums sur DEAE-cellulose et localisé les iso-hémagglutinines dans le diagramme d'élution. Ils constatent que la répartition des anticorps est très hétérogène. Les fractions actives n'ont pas été identifiées par d'autres moyens que l'électrophorèse. Au cours de recherches ultérieures, les chercheurs du même groupe [142] montrent que les iso-agglutinines anti-A actives en milieu salé, sont réparties en deux fractions bien distinctes : la première est surtout riche en γ-globulines, la seconde en β-globulines.

A la même époque et par des techniques comparables, Fahey et Morisson [47] conclurent aussi à l'existence de deux types d'hémagglutinines naturelles lourdes et légères. Cependant, à l'inverse de précédents auteurs, ils constatent une prédominance de l'activité des molécules lourdes chez les sujets de groupe sanguin O.

En 1961, Yokoyama et coll. [196] reprenant cette étude chromatographique sur DEAE-cellulose, confirment les points essentiels des résultats des précédents auteurs : il est possible d'obtenir trois fractions dont deux possèdent une constante de sédimentation de 6,6S et migrent respectivement comme des γ_2 et γ_1-globulines. La troisième migre aussi comme une γ_1-globuline, mais possède une constante de sédimentation de 17,5S. L'activité hémagglutinante se trouve principalement localisée au niveau de cette dernière fraction, surtout lorsqu'il s'agit de sujets du groupe A ou B.

Plus récemment, Högman et Killander [81] ont appliqué les nouvelles méthodes utilisant le gel de dextrane et principalement la filtration moléculaire sur ce gel. De leur étude des iso-hémagglutinines anti A, ils concluent qu'on peut aisément séparer deux types d'anticorps, l'un de haut poids moléculaire passant le premier dans la colonne, l'autre plus léger. Par une technique améliorée, Killander [94] a récemment montré qu'on pouvait obtenir une fraction intermédiaire possédant une activité hémagglutinante. Il est possible qu'il s'agisse de β_2A-globuline.

Plusieurs travaux ont été consacrés à l'élucidation de la nature des anticorps naturels dirigés vers d'autres groupes sanguins.

Une étude assez complète a été effectuée par Adinolfi et ses collaborateurs [3]. Ces auteurs constatent que les anticorps naturels des systèmes Le, MNSs et P sont avant tout des β_2-macroglobulines. Ces résultats furent obtenus par trois méthodes différentes : chromatographie sur DEAE-cellulose, utilisation de sérums antiglobulines spécifiques pour les β_2M- ou les γ-globulines, action du mercapto-éthanol. A des rares exceptions près, les résultats donnés par ces trois méthodes concordent. Les anticorps macroglobuliniques se comportent habituellement comme des agglutinines, tandis que les anticorps légers sont souvent des anticorps incomplets. La capacité de fixer le complément ne paraît pas liée à la taille particulaire de l'anticorps.

Ces travaux étendent et confirment les observations similaires faites par divers auteurs du même groupe ou non. Stratton [169] a montré à l'aide de sérums antiglobulines spécifiques et par l'action du mercapto-éthanol que l'anticorps anti-Le est de nature macroglobulinique. Kekwick et Mollison [93] fractionnant les sérums par l'éther éthylique et effectuant des contrôles

par ultracentrifugation ont conclu que « dans la règle les anticorps naturels semblent être composés de globulines 19S ». Généralement ce sont des agglutinines, plus rarement des hémolysines ou des anticorps incomplets.

Polley, Mollison et Soothill [139] montrent à l'aide de sérums antiglobulines spécifiques pour les composants 19S, que les anticorps naturels incomplets anti-Le, anti-H (O), anti-P, anti-I, sont de nature macroglobulinique.

Les anticorps anti-érythrocytaires survenant après stimulation antigénique ont également attiré l'attention des chercheurs. Certaines érythroblastoses du nouveau-né sont dues à une incompatibilité fœto-maternelle portant sur les antigènes globulaires ABO. Les anticorps produits par la mère peuvent être considérés comme résultant d'une immunisation. Fudenberg et ses collaborateurs [61] ont prédit que l'érythroblastose fœtale ne pouvait s'expliquer que si les anticorps élaborés par la mère sont des γ-globulines légères, capables de franchir le placenta. Les γ-globulines *sensu stricto* possèdent, en effet, au sein de leur molécule, un motif chimique qui leur permet de franchir les membranes biologiques [18], motif que ne paraissent posséder ni la β_2A, ni la β_2M-globuline. Les recherches de Kochwa et de ses collaborateurs [96] ont confirmé ce point de vue : les anticorps immuns anti-A ou anti-B, au cours de l'érythroblastose fœtale, sont toujours des γ-globulines 7S. Ces résultats obtenus à l'aide de fractionnements chromatographiques sur DEAE-cellulose ont été confirmés par Polley, Mollison et Soothill [139] par une méthode immunologique utilisant des sérums antiglobulines spécifiques.

Les cas les plus fréquents d'érythroblastose sont dus à une incompatibilité Rh. Les anticorps Rh ne sont, en effet, pas spontanés et n'apparaissent qu'au cours des

immunisations que peuvent provoquer la grossesse ou la transfusion sanguine. Les nombreuses études faites sur ces anticorps par des méthodes différentes, concordent cependant : les anticorps Rh complets (actifs en milieu salin) sont macroglobuliniques, et les anticorps incomplets, bloquants, révélés par la réaction de Coombs sont γ-globuliniques [1, 2, 3, 21, 34, 70, 93, 139, 163, 196].

La seule note discordante est apportée par KILLANDER [94] qui, d'expériences de filtration sur Sephadex G 200, déduit que certains anticorps Rh sont de type « intermédiaire » et pourraient être de nature β_2A-globulinique.

Les anticorps d'autres groupes sanguins paraissent être de nature macroglobulinique. Toutefois, ADINOLFI et coll. [3] ont souligné qu'il existe des exceptions. Certaines macroglobulines (par exemple certaines anti-Jk) se comportent comme des anticorps incomplets. Inversement, certaines γ-globulines peuvent agir comme des agglutinines.

De nombreux travaux ont été entrepris sur les agglutinines à froid : leurs conclusions sont identiques : ces agglutinines sont toujours des macroglobulines.

GORDON [66] fut en 1953 le premier à préparer une telle agglutinine. Il le fit d'une façon simple, en recueillant les globules agglutinés à 4°C et en les portant à 37°C ce qui permet l'élution de l'anticorps. A l'ultracentrifugation, la majeure part de l'éluat migrait rapidement, avec une constante de 18S. WEBER [186] confirma les résultats de GORDON en appliquant la même méthode. CHRISTENSON et coll. [23], à l'aide de la technique chromatographique sur DEAE-cellulose, l'étude de l'absorption de l'anticorps par les hématies, l'ultracentrifugation, confirment aussi ces données. FUDENBERG et KUNKEL [60] se servent de la technique efficace d'ultracentrifugation en gradient de densité, et concluent de même. MEHROTRA [119], employant la technique de préparation de GORDON [66], identifie les macroglobulines par

des tests immunologiques. Citons encore les travaux d'Ostrowski et coll. [126], de Van Loghem [182] à l'appui de ces conclusions. Certaines agglutinines à froid se rencontrent dans des sérums de sujets ne présentant nul trouble pathologique [60]. Elles sont de nature macroglobulinique comme celles rencontrées au cours des pneumonies à virus, de syndromes de Raynaud ou d'anémie hémolytique. Certains sérums contiennent un anticorps hétérophile : ceci se voit chez certains sujets par ailleurs normaux, au cours de certaines cirrhoses mais surtout de la mononucléose infectieuse. Ces divers types d'anticorps ont des propriétés diverses mais ils se ressemblent en ce qu'ils sont tous de nature macroglobulinique [98, 137].

Anticorps bactériens.

La nature des anticorps dirigés contre les éléments figurés du sang a fait comme on l'a vu, l'objet d'un grand nombre de travaux, mais les chercheurs se sont aussi intéressés aux anticorps induits par d'autres types d'antigènes : micro-organismes, virus, substances chimiques.

Les anticorps survenant au cours d'infections bactériennes ont suscité divers travaux.

Les plus étudiés ont certainement été les anticorps survenant au cours de l'immunisation naturelle ou artificielle par les salmonellas. Les premiers travaux furent menés à bien en 1946 par Deutsch et ses collaborateurs [32, 33]. Un procédé de fractionnement par l'alcool leur permit de séparer, quoique imparfaitement, les γ_1-macroglobulines 19S des γ_2-globulines 7S. Ils constatent que les anticorps correspondant à l'antigène somatique O sont localisés nettement au niveau de cette première fraction. Les résultats sont moins nets avec l'antigène flagellaire H.

En 1959, Schultze [157] rend brièvement compte

des résultats de son travail sur la localisation des anticorps au niveau de fractions purifiées dont il n'indique pas le mode de préparation. Il constate que les anticorps anti-typhique O se trouvent surtout liés à la β_2-macroglobuline, existent encore dans la fraction β_{2A}-globulinique (à la vérité contenant des traces de β_2-macroglobuline) et assez peu dans les γ-globulines. Pour l'antigène flagellaire H, les anticorps se trouvent répartis entre γ- et β_2-macroglobuline et plus faiblement sur la β_{2A}-globuline. Les anticorps anti-paratyphique B se trouvent de façon prédominante avec les macroglobulines et un peu dans les autres types. Fahey [43] fractionnant des sérums sur DEAE-cellulose, trouve les anticorps anti H et anti O dans deux fractions complètement différentes. Les premiers sont liés aux γ-globulines et les seconds dans une fraction riche en macroglobulines. Grubb et Swahn [70] montrent que l'activité anti-antigène O est pratiquement détruite par le mercapto-éthanol. Au contraire, l'activité contre l'antigène H-b demeure intacte. Toutefois, avec d'autres types d'antigène H (H-d, H-g, m) le mercapto-éthanol détruit largement l'activité anticorps.

Une étude récente et particulièrement intéressante de LoSpalluto et coll. [108] confirme et étend ces résultats. Une immunisation par un vaccin mixte (typhique et paratyphique) provoque une réponse précoce essentiellement due à des anticorps lourds, comme le montre la chromatographie sur DEAE-cellulose et l'action du mercapto-éthanol. La voie d'immunisation ne modifie pas cette règle.

Si l'on continue l'immunisation, les anticorps anti-typhiques H et anti-paratyphiques A et B se localisent surtout au niveau des γ globulines légères. En revanche, les anticorps anti-typhique O demeurent exclusivement macroglobuliniques. Pour le premier groupe d'antigènes,

le changement de type demande plus de six mois chez l'adulte et est rarement complet : il persiste des anticorps macro-globuliniques. Le même groupe de chercheurs [53] confirme ces résultats chez les enfants, les nouveaux-nés et même les prématurés qui sont capables de répondre par la production d'anticorps macroglobuliniques. Toutefois le changement de type se fait plus rapidement que pour les adultes avec les antigènes typhiques H et paratyphiques A et B : il se fait en 3 à 4 mois. Les anticorps maternels transférés par le placenta, appartiennent toujours au type 7S.

Heremans et coll. [80] ont rapporté les résultats d'une étude du sérum de malades atteints d'une brucellose à *B. abortus*. Le pouvoir agglutinant se retrouvait à des titres comparables dans les trois types d'immunoglobulines.

Le poids moléculaire des anticorps anti-pneumococciques est connu depuis 1939, grâce aux travaux de Kabat [90]. Il s'agit de γ-globulines normales, comme chez le lapin et le singe, alors que la vache, le porc et le cheval répondent par la sécrétion d'anticorps lourds.

Franklin [57] cite le streptocoque M.G. parmi les bactéries capables de déterminer l'apparition d'anticorps macroglobuliniques. Havez et coll. [74] ont montré par chromatographie sur DEAE cellulose que les anti-streptolysines qui apparaissent dans les sérums des sujets infectés par le *Streptococcus pyogenes* du groupe A, sont des γss-globulines. Selon Schultze [157] les anticorps dirigés contre *H. pertussis* sont exclusivement γ-globuliniques.

Les bacilles diphtériques et tétaniques sécrètent une toxine protéique et les anticorps anti-toxiques ont également été étudiés. Schultze [157] et Heremans et coll. [80] s'accordent à trouver les anticorps anti-diphtériques répartis entre les trois immunoglobu-

lines avec toutefois pour Schultze une activité prédominante des γ-globulines au détriment de la β_2-macroglobuline. Au cours des plus anciennes expériences de Deutsch et coll. [33] l'activité anti-toxique se trouvait également répartie entre la fraction γ_1 (contenant une grande part de macroglobulines) et la fraction γ_2 (contenant essentiellement des γss-globulines). Les anti-toxines tétaniques peuvent être, selon Schultze [157] des γ, des β_{2A} ou des β_2-macroglobulines.

Les anticorps anti-mycosiques n'ont été étudiés sous ce rapport qu'une seule fois. Fahey [43] a constaté par chromatographie sur DEAE-cellulose qu'ils sont uniquement de nature γ-globulinique.

La nature des anticorps anti-viraux n'a également fait l'objet que d'un petit nombre de travaux. Fahey [43], dans la même étude, indique que les anticorps ourliens sont γ-globuliniques. Pour Schultze [157] les anticorps anti-poliomyélitiques (type I-III) sont également répartis entre les trois immunoglobulines.

Les seuls travaux sur la grippe datent de 1946 : Deutsch et coll. [32, 33] ont vu que la répartition des anticorps varie selon les malades, prédominant tantôt dans la fraction lourde, tantôt dans la fraction légère.

Nous avons déjà évoqué plus haut la nature des anticorps hétérophiles rencontrés au cours de la mononucléose infectieuse.

Peu d'études concernent les maladies causées par des protozoaires. Dès 1939, V. Deutsch [37] montre qu'à l'ultracentrifugation la réagine syphilitique sédimente beaucoup plus rapidement que les globulines normales. En 1945, Davis et ses collaborateurs [26], purent préparer par dissociation spécifique du floculat antigène-anticorps, la réagine syphilitique assez purifiée (ils esti-

ment que leur préparation contenait jusqu'à 87 % de réagine). Cet anticorps migre à l'électrophorèse entre les β et les γ globulines et sédimente rapidement à l'ultracentrifugation (S = 19).

Filitti-Wurmser et Hartman [52] mentionnent que l'activité anticorps d'un sérum de malade atteint de leptospirose à *L. australis* est concentrée dans la fraction macroglobulinique.

Auto-anticorps.

Le problème de la nature des auto-anticorps n'a pas manqué d'attirer l'attention des chercheurs. Nous avons déjà mentionné plus haut les travaux concernant les anticorps dirigés contre les éléments figurés du sang. Outre ceux-ci, quatre types d'anticorps ont été particulièrement étudiés : les anticorps anti-thyroïdiens, particulièrement nets au cours de la maladie de Hashimoto, les auto-anticorps survenant au cours du lupus érythémateux, ceux des granulo-cytopénies idiopathiques et des purpuras thrombocytopéniques et enfin le facteur rhumatoïde.

Pressmann et ses collaborateurs [143] furent les premiers à étudier la localisation des anticorps anti-thyroïdiens au cours d'une maladie de Hashimoto. L'ultracentrifugation montra qu'ils étaient de nature macroglobulinique et, fait spécialement intéressant, se comportaient comme des précipitines. Korngold et coll. [97] reprirent cette étude tant par ultracentrifugation que par une méthode immunologique originale. Ils concluent que les anticorps peuvent être soit des γ globulines *sensu stricto*, soit des macroglobulines. Sur quatre sérums un seul appartenait à ce dernier type et dans ce cas, la macroglobuline avait bien la qualité de précipitine. Fahey [43], étudiant la répartition de l'activité anti-

thyroïdienne après chromatographie sur DEAE-cellulose, la trouve confinée aux γ-globulines. Bonomo et coll. [14] se sont intéressés aux divers types d'auto-anticorps qui peuvent se rencontrer au cours de la lèpre. La chromatographie sur DEAE-cellulose de deux sérums, leur permet de localiser l'activité anti-thyroïdienne au niveau des macroglobulines. En revanche, dans un cas de maladie de Hashimoto, ils la rencontrent au niveau des γ-globulines. Roitt et coll. [149], par une technique similaire, obtiennent des résultats identiques. En outre, ils constatent la présence d'anticorps dans des fractions de mobilité intermédiaire aux globulines 7S et 19S.

Le lupus érythémateux disséminés constitue l'exemple type de la maladie par auto-anticorps. Le sérum de ces malades contient une substance responsable de l'apparition des cellules caractéristiques du lupus érythémateux (cellule LE). D'autre part, les recherches réalisées au cours de la précédente décade ont montré l'existence d'anticorps dirigés contre les noyaux cellulaires (à la fois contre l'acide desoxyribonucléique et contre d'autres éléments du noyau). Willkens et ses collaborateurs [195] ont étudié la nature de la substance capable de promouvoir la formation de cellules L.E. Par chromatographie sur carboxy-méthyl-cellulose, ils ont pu la purifier partiellement et montrer qu'il s'agit d'une γ-globuline typique. Goodman, Fahey, Malmgren et Brecher [64] ont confirmé cette conclusion par chromatographie sur DEAE-cellulose. En outre, ils ont montré que l'activité anticorps dirigée contre les noyaux cellulaires n'est qu'en partie sous la dépendance de cet anticorps : il existe une autre fraction, macroglobulinique, participant à ce processus. Cette fraction a une nette activité antinucléoprotéine, que ne possède guère la fraction γ-globulinique. L'activité antinucléaire est donc partagée entre deux types d'anti-corps. Bonomo et coll. [14]

utilisent aussi la chromatographie sur DEAE-cellulose et confirment cette dualité; mais ils trouvent l'activité anti-nucléoprotéine au niveau des γ-globulines légères. Ils montrent qu'au cours de la lèpre, des facteurs similaires apparaissent avec exactement le même comportement chromatographique.

Auerswald et coll. [6] ont étudié les sérums de malades atteints de granulocytopénies idiopathiques et de purpura thrombocytopéniques qui présentaient une réaction positive au test de consommation de l'anti-globuline. Ces sérums et des sérums normaux ont été incubés avec des leucocytes et des thrombocytes respectivement. Après lavage, les protéines fixées sur ces cellules qui contiennent en principe les auto-anticorps, sont éluées par chauffage. La permanence de l'activité anticorps de ces fractions est vérifiée par injection au lapin. Leur nature est examinée par électrophorèse, analyse immuno-électrophorétique, ultracentrifugation analytique. Seule une fraction 7S et une fraction 12S paraissent correspondre à une fixation spécifique sur les cellules. A l'immuno-électrophorèse on ne trouve avec régularité qu'un trait γ-globulinique. Les auteurs pensent donc que telle serait la nature de ces auto-anticorps.

Le facteur rhumatoïde, protéine capable d'agglutiner des hématies ou des particules inertes, revêtues de γ-globulines, présente dans le sérum de malades atteints de polyarthrite chronique évolutive (P.C.E.), a fait l'objet d'un nombre considérable de travaux que nous n'analyserons pas ici. Ce facteur a été identifié à une macroglobuline par ultracentrifugation [58] par chromatographie sur carboxy-méthyl-cellulose [170] ou sur DEAE cellulose [109]. De nombreuses investigations par d'autres procédés ont confirmé cette conclusion. On s'accorde pour admettre que le facteur rhumatoïde est un auto-anticorps dirigé contre les γ-globulines. La stimulation

antigénique proviendrait de la fixation anormale des γ-globulines sur une autre substance, peut-être au niveau des membranes synoviales. La formation de ce complexe immunogène serait liée au processus pathologique de la P.C.E. Jusqu'ici la nature précise de l'antigène est demeurée inconnue. Dans le sang circulant, le facteur rhumatoïde se trouve sous forme d'un complexe où une molécule de macroglobuline se trouve liée à approximativement six molécules de γ-globulines [98].

Il n'existe pratiquement pas de travaux sur les anticorps non allergisants survenant après l'immunisation de l'homme par des substances chimiques purifiées. Toutefois, Kabat [91] a mesuré la constante de sédimentation de l'anti-corps anti-dextrane : c'est une globuline légère.

Anticorps allergiques.

Le problème de la nature des anticorps responsable des phénomènes allergiques de type immédiat, donne lieu à d'intéressants travaux. Pendant longtemps, les tentatives de fractionnement furent limitées aux procédés électrophorétiques avec des résultats variables selon les auteurs. La chromatographie sur DEAE-cellulose fut appliquée à ce problème par Humphrey et Porter [84]. Ils constatent que les réagines de sujets sensibilisés à divers antigènes, sont localisées assez étroitement à une sous-fraction γ-globulinique. Cette sous-fraction migre à l'électrophorèse comme une γ_1-globuline. Stanworth [164] reprit ses expériences avec des sérums de malades sensibilisés aux pellicules de cheval et réalisa en outre, la recherche de l'activité réaginique après ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose. Ses expériences confirment en gros les résultats des précédents auteurs, c'est-à-dire que la majeure part de l'activité réaginique est localisée à une sous-fraction γ-globulinique rapide. Mais il ne s'agit pas d'une macroglobuline, car sa constante

de sédimentation est de 7S. Stanworth souligne la fragilité de cette molécule dont l'activité biologique est fortement diminuée par les manipulations (ultrafiltration, mise en présence de saccharose non tamponné par exemple). Deux autres groupes de chercheurs se sont efforcés d'isoler ou tout au moins de préparer des fractions enrichies en réagines, par chromatographie sur DEAE-cellulose. Perelmutter et coll. [135] séparent par ce moyen l'activité hémagglutinante du pouvoir de sensibilisation, confirmant les données de Stanworth [164]. La première fraction est également un anticorps bloquant, inhibant la réaction de Prausnitz-Küstner. Cette fraction sort de la colonne avec la masse des γ-globulines. Augustin et Hayward [7] avec une technique légèrement différente obtiennent des résultats dans l'ensemble assez comparables. Ces divers auteurs s'accordent, en effet, pour retrouver dans la fraction éluée à pH = 6,1 ou 6,2, la majeure part de l'activité sensibilisante. L'ionicité des tampons varie toutefois d'un expérimentateur à l'autre; tous soulignent que cette méthode entraîne de fortes pertes de l'activité réaginique.

Nous avons vu que pour Stanworth il s'agit de γ-globulines migrant à l'ultracentrifugation avec une constante de 7S. Heimlich et coll. [77], Augustin et Hayward ont également pratiqué des ultra-centrifugations et les conclusions de ces divers chercheurs sont contradictoires.

Heimlich et coll. [77] centrifugent du sérum de malade pendant plusieurs heures de façon à obtenir une pastille protéique au fond du tube. Augustin et Hayward [7] font de même avec des fractions obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose. Ce type d'expérience est d'interprétation difficile : ces auteurs pensent néanmoins que les anticorps ne sont pas des anticorps lourds, macroglobuliniques. Gyenes, Gordon et Sehon

[71] distinguent nettement les anticorps bloquants, des anticorps sensibilisants, les premiers sont fait de globulines légères 7S. Au contraire, les seconds, en opposition avec les précédents auteurs, leur paraissent être des anticorps lourds. Ils insistent sur les difficultés de la méthode, car la constante de sédimentation mesurée avec une cellule à compartiments, varie avec la durée de la centrifugation qui permet de la mesurer : dans leurs expériences, les constantes varient de 12,4 à 22,5S. Ils pensent néanmoins que la valeur réelle est de l'ordre de 19S.

Les plus récentes expériences de Rockey et Kunkel [148] pratiquées avec une méthode améliorée d'ultracentrifugation en gradient de densité paraissent indiquer que les conclusions des auteurs précédents sont toutes à réexaminer. En effet, Rockey et Kunkel attribuent aux anticorps sensibilisants une constante de sédimentation intermédiaire, allant de 9 à 15S. Ces anticorps sont sensibles à l'action du mercapto-éthanol. Il est possible qu'ils soient de nature β_2A-globulinique.

Les fractions sensibilisantes isolées par chromatographie sur DEAE-cellulose ont été également étudiées par les méthodes immuno-chimiques. Les études immuno-électrophorétiques de Stanworth [164] s'accorderaient avec la conclusion que les réagines sont des γ-globulines mais leur précision est insuffisante pour qu'il soit possible de conclure. Augustin et Hayward [7] ne tirent pas davantage de conclusion définitive de leurs expériences : il s'agit probablement de γ-globulines, mais il n'est pas exclu que la β_2A-globuline soit en cause.

Les travaux du groupe d'Heremans et de celui de Goodman ont donné récemment beaucoup de probabilité à cette hypothèse. Heremans et coll. [77, 78] ont préparé des fractions pures de β_2A-globuline par une méthode originale au sulfate de zinc. Ils ont constaté que

l'activité réaginique contre des pollens est, au moins en partie, liée à cette fraction. Le récent travail de Fireman, Vannier et Goodman [54], ajoute encore du poids à cette conclusion. Ces auteurs étudiant trois sérums de sujets sensibilisés au pollen, montrent que l'absorption des β_{2A}-globulines par un immun-sérum spécifique, lui ôte toute possibilité de transfert passif de la sensibilisation. Ils éliminent la contribution des macroglobulines en les préparant par filtration moléculaire sur Sephadex G 200 : elles sont dépourvues de toute activité. Ils éliminent également la contribution des γ-globulines par la même méthode d'absorption par un immun-sérum spécifique anti-γ-globulines. Leur conclusion est formelle pour les trois sérums étudiés : la réagine est une β_{2A}-globuline.

Conclusion

Cette revue bibliographique sur la localisation du pouvoir anticorps apporte beaucoup de faits, d'où un nombre limité de conclusions peuvent être tirées.

La première réaction à une stimulation antigénique, paraît bien être de nature macroglobulinique. Elle fait ensuite généralement place à une réponse γ-globulinique. Il existe toutefois des exceptions : l'antigène typhique O, par exemple, donne lieu à une synthèse d'anticorps macroglobuliniques exclusivement.

Les anticorps naturels que sont les isohémagglutinines sont le plus souvent macroglobuliniques : mais il faut attendre que le rôle de la β_{2A}-globuline soit mieux connu pour tirer des conclusions fermes. Il semble bien que les études faites par ultracentrifugation et chromatographie sur DEAE-cellulose, ont négligé trop souvent le repérage précis de cette molécule. Les réducteurs comme le mercapto-éthanol paraissent aussi actifs sur la β_{2A}-globuline. Ce test ne peut donc servir à différencier ces deux types de molécules.

La voie d'immunisation ne semble avoir qu'une importance limitée.

La réponse varie d'une espèce animale à l'autre, comme le montrent bien les premières recherches sur les anticorps anti-pneumococciques qui sont des γ-globulines chez certaines espèces comme le lapin, le singe ou l'homme, et des macroglobulines chez d'autres comme le cheval ou la vache.

Le rôle de la β_2A-globuline demande à être encore précisé, mais il est de plus en plus probable qu'elle joue un rôle important au cours des phénomènes allergiques.

La détermination de la production de tel ou tel type d'anticorps demeure mystérieux. Roitt et coll. [149] ont réalisé des expériences d'immunisation du lapin à l'aide d'antigènes tels que les γ-globulines et la thyroglobuline, qui apportent des faits nouveaux et suggèrent des hypothèses de travail. Injectant ces antigènes par les procédés habituels, la réponse macroglobulinique initiale devient rapidement γ-globulinique. Si toutefois ils fixent ces antigènes sur des particules solides (latex ou globules rouges) et les injectent régulièrement par voie intraveineuse à l'animal, il y a persistance de la synthèse de macroglobulines. Si l'on stoppe les injections, les anticorps γ-globuliniques augmentent et deviennent prédominants. Ainsi la forme physique sous laquelle est présentée l'antigène, paraît avoir une importance de premier plan, de même que la régularité de l'apport antigénique sous cette même forme. Ces expériences ouvrent une nouvelle voie de recherche pour l'élucidation des raisons qui orientent spécifiquement la biosynthèse de l'un des trois types d'immuno-globulines.

CHAPITRE 3

MÉTHODES DE PRÉPARATION ET DE MISE EN ÉVIDENCE DES IMMUNO-GLOBULINES SÉRIQUES

Le rôle des diverses globulines possédant un pouvoir anticorps n'a pu être établi qu'à l'aide de méthodes permettant leur isolement, ou tout au moins la mise en évidence indirecte de leur effet. Nous passerons en revue dans ce chapitre les principaux procédés utilisés.

Préparation des immuno-globulines

Le but recherché est d'obtenir des protéines pures, possédant un pouvoir anticorps. Ceci pose aussitôt un problème fondamental : quel critère de pureté faut-il employer ? Les globulines sériques immunitaires constituent, en effet, une famille de protéines qui n'ont, à première vue, en commun que deux caractères : leur activité biologique d'anticorps et, sous l'angle physico-chimique, leur caractère relativement basique qui se manifeste particulièrement par le fait, qu'à l'électrophorèse, elles sont groupées dans la zone des mobilités les plus faibles, c'est-à-dire, celle des γ-globulines au sens large du terme. Au reste, cette zone est assez vaste et il ne fait pas de doute qu'entre les γ-globulines les

plus rapides et les plus lentes, existent d'importantes différences structurales, que l'on peut imputer au nombre et à la qualité des groupements ionisables disposés à la surface de la molécule.

La méthode d'analyse immuno-électrophorétique révèle des différences plus importantes encore de spécificité antigénique, et permet de dénombrer trois types immunochimiques de globulines à pouvoir anticorps. Les γ *globulines proprement dites* (γss) constituent une famille de protéines caractérisées par leur homogénéité immunologique, mais aussi par leur hétérogénéité physico-chimique, prouvée par l'étalement de leurs mobilités sur une zone très vaste, allant de la région des α_2-globulines sériques jusqu'à la limite cathodique du diagramme électrophorétique (dite encore région des γ_2-globulines). Les β_2A-*globulines* occupent une surface encore assez vaste mais dans une région plus anodique (zone β_2 ou γ_1, selon les nomenclatures). Il en est de même des macroglobulines anticorps dénommés β_2-*macroglobulines* dans la nomenclature immuno-électrophorétique.

Il en résulte que si l'on considère la région β-γ du diagramme électrophorétique, la moitié cathodique est occupée par des γss globulines presque pures, dites encore γ_2-globulines, tandis que la région anodique porte un mélange de trois types immunochimiques de globulines anticorps : les β_2A, β_2M et γ_1-globulines (ces dénominations γ_1 et γ_2-globulines n'indiquant que les différences de mobilités d'une même variété immunochimique des γss-globulines).

Ainsi est mise en évidence la complexité du problème, qui augmente encore si l'on considère les différences de taille particulaire, bien mise en évidence par l'ultracentrifugation. Les γss ont une constante de sédimentation de l'ordre de 7S, les β_2M de l'ordre de 19S; quant à la β_2A-globuline normale, ses caractères sédimentaires ne

sont pas encore fermement établis, mais paraissent actuellement intermédiaires entre ces deux extrêmes.

Il faut donc choisir un critère d'homogénéité : mobilité, masse particulaire, spécificité antigénique, pour ne considérer que les caractères les plus utilisés. Bien que la nature des différences antigéniques soit encore largement inconnue, celles-ci paraissent refléter des différences structurales plus profondes que les autres caractères, et c'est pourquoi nous axerons cette revue sur les procédés d'obtention d'immuno-globulines homogènes sous l'angle antigénique.

On peut penser d'emblée que les procédés d'électrophorèse préparative ne permettent l'obtention dans un assez bon état de pureté que des γ_2-globulines. La région plus anodique est, en effet, occupée par un mélange des trois immuno-globulines. Toutes les méthodes de fractionnement basées sur la teneur en groupements ionisables, conférant à la molécule une charge brute (généralement négative) plus ou moins forte, buteront sur le même écueil; c'est en particulier le cas des chromatographies sur cellulose à pouvoir d'échange ionique : carboxy-méthyl-cellulose (CM-cellulose) et surtout diéthyl-amino-éthyl-cellulose (DEAE-cellulose); on n'obtient de séparation parfaite que pour une partie des γ-globulines.

Si nous nous adressons à l'ultracentrifugation préparative, il n'est possible d'obtenir à l'état pur que des β_2-macroglobulines (à condition de recourir à des techniques spéciales, et d'avoir préalablement éliminé les α_2-macroglobulines sériques). Une récente technique, la filtration sur colonne de gel de dextrane, permet de laisser passer rapidement les grosses molécules, tandis que les plus petites particules sont retardées. Grosso modo, le résultat est le même que par ultracentrifugation avec des moyens toutefois beaucoup plus simples. Ces pro-

cédés n'apportent pas de solution aisée au problème de l'isolement des immunoglobulines de faible poids moléculaires et l'on peut prévoir que de toutes celles-ci, la β_2A-globuline et les $\gamma_1$ss-globulines, seront les plus difficiles à obtenir à l'état pur.

Deux voies de recherches restent ouvertes :

— l'une tend à la découverte de produits agissant spécifiquement sur tel ou tel type d'immunoglobuline. Ainsi Heremans [78] a-t-il pu isoler la β_2A-globuline grâce à l'action précipitante des ions Zn^{++} sur les β_2M et γ-globulines, laissant la β_2A-globuline en solution;

— l'autre consiste à jouer patiemment sur de petites différences entre les caractères physico-chimiques. En associant judicieusement divers procédés, par exemple précipitation par les sels neutres, chromatographie sur celluloses modifiées, électrophorèse, etc., on peut parvenir à purifier suffisamment la protéine recherchée. Tel est l'orientation des recherches poursuivies par Havez et coll. [75] pour l'isolement de la β_2A-globuline. Il s'agit dans ce cas de méthodes exigeant un bon nombre de manipulations.

Nous passerons en revue les procédés utilisés pour la préparation des divers types d'immunoglobulines, en résumant chemin faisant, les caractères technologiques essentiels des méthodes utilisées.

γ-globulines

Les méthodes les plus classiques de préparation des γ-globulines sont des *méthodes de précipitation.* Les agents de précipitation peuvent être les sels neutres (et tout spécialement le sulfate d'ammonium), les solvants organiques à froid (le plus employé étant l'éthanol), des ions métalliques (en particulier les ions Zn^{++}), des

composés organiques (par exemple le rivanol). Un grand nombre de facteurs interviennent au cours de ces fractionnements : en particulier le pH, la force ionique, la constante diélectrique du milieu, et la concentration protéique. Il est évident que ces paramètres doivent pouvoir être rigoureusement contrôlés pour pouvoir donner lieu à des séparations reproductibles.

Ces méthodes ont fait l'objet d'une revue générale récente de PENNEL [134]. Nous n'y insisterons pas car généralement elles sont incapables de donner des préparations satisfaisantes aux critères particulièrement rigoureux de l'analyse immuno-électrophorétique. La plupart de ces procédés ont été élaborés à une époque où ce mode de contrôle n'existait pas. En revanche, ces méthodes gardent toute leur valeur lorsqu'on n'exige pas une pureté parfaite de la substance à isoler ou qu'on envisage des préparations industrielles à grande échelle, pour lesquelles elles sont particulièrement bien adaptées. De plus, même lorsqu'on désire parvenir à une préparation de haute pureté, ces méthodes peuvent être utiles, car elles permettent d'obtenir une préparation enrichie comme matière première d'un fractionnement par d'autres procédés plus spécifiques.

L'électrophorèse de zone préparative constitue un excellent moyen de préparation de γ-globulines immunologiquement pures. Les milieux stabilisants les plus utilisés sont : l'amidon en grains, la gélose, diverses préparations à bases de résines synthétiques. Il est aisé de construire des appareils permettant la séparation de 50 ou 100 ml de solution protéique. On repère (par exemple par coloration d'une bande témoin) l'emplacement des γ-globulines et l'on prélève la zone la plus cathodique qui n'est souillée par nul composant β_2. Après élution, dialyse et concentration on obtient ainsi aisément une préparation de γ-globulines immunologiquement homo-

gènes. Néanmoins, cette préparation ne constitue pas un échantillon représentatif de l'ensemble des γ-globulines, presque toutes les molécules de mobilité β_2 (ou γ_1) s'en trouvant exclues.

Une méthode particulièrement simple et efficace est la *chromatographie sur celluloses modifiées à pouvoir d'échange ionique*. Comme on l'a vu au chapitre II, cette méthode a été très largement utilisée pour l'étude de la répartition de l'activité anticorps dans l'effluent des colonnes chromatographiques ou pour la préparation de fractions pures, particulièrement aisées à obtenir dans le cas de γ-globulines. Ces celluloses modifiées ont été synthétisées à la suite d'expériences encourageantes de fractionnements chromatographiques sur résines échangeuses d'ions. Toutefois, la faible capacité d'absorption de ce matériel ne permettait la manipulation que de très petites quantités de protéines. Aussi en 1954, Sober et Peterson [160] ont-ils traité de la cellulose purifiée soit par de l'acide chloracétique, fixant ainsi des groupements $—CH_2 — COOH$ sur la molécule (carboxy-méthyl cellulose ou CM-cellulose), soit par de la 2-chloro-NN-diéthyl-éthylamine : le produit obtenu résultant de la fixation de groupements

$$— CH_2 — CH_2 — N \begin{cases} CH_2 — CH_3 \\ CH_2 — CH_3 \end{cases}$$

est nommé diéthyl-amino-éthyl ou DEAE-cellulose.

Ces deux composés peuvent fonctionner comme échangeurs de cations ou d'anions respectivement.

En raison de leur caractères amphotère, les protéines peuvent se comporter comme des anions ou des cations. Il suffit d'ajuster convenablement les conditions du milieu solvant. Il en résulte qu'en faisant varier les caractères physico-chimiques du solvant, il est possible de

fixer ou d'éluer une protéine donnée sur une cellulose échangeuse d'ions. Ces diverses protéines n'ont pas la même composition en groupements ionisables et les conditions d'absorption diffèrent d'une espèce moléculaire à l'autre. Ceci donne donc la possibilité d'une fixation différentielle, et de fractionnements chromatographiques en colonne. Le principe généralement adopté est le suivant : une colonne chromatographique est préparée avec une cellulose modifiée et équilibrée avec une solution tampon telle que, dans ces conditions, toutes les protéines du mélange à séparer puissent être fixées sur la cellulose lorsqu'on applique la solution protéique. On fait écouler ensuite une solution tampon dont la composition varie continuellement (réalisant un gradient de pH ou de force ionique ou les deux ensemble) ou par palier. On assiste alors à une élution différentielle des protéines du mélange [159] qui émergent successivement de la colonne. La température doit être maintenue rigoureusement constante.

De nombreuses autres celluloses modifiées à pouvoir d'échange ionique ont été préparées [136] mais il semble que ce soit la DEAE-cellulose qui ait jusqu'à présent manifesté le plus de possibilités. La chromatographie sur DEAE-cellulose a été appliquée au fractionnement d'un grand nombre de mélanges biologiques et en particulier aux sérums humains et animaux [159, 46]. Il est rapidement apparu que dans les conditions usuellement adoptées (où l'élution initiale se fait avec un tampon assez alcalin (pH = 7 à 8) et faiblement concentré, et où la force ionique du tampon va croissant tandis que le pH décroît) les premières protéines quittant la colonne étaient constituées de γ-globulines pures, satisfaisant aux critères de l'analyse immuno-électrophorétique.

Plusieurs travaux ont été consacrés au fractionnement

chromatographique des γ-globulines. En 1957, Humphrey et Porter [84] faisaient paraître une étude sur le fractionnement du sérum de six sujets allergiques. La localisation des réagines était simultanément recherchée. Par ce procédé, ils constatent que les γ-globulines (au sens électrophorétique) peuvent être divisées en quatre fractions, selon leur ordre de sortie et que la majorité des réagines se trouve dans le troisième. En 1959, Fahey et Horbett [44] et LoSpalluto et coll. [107] montrent que cette technique permet d'obtenir des γ-globulines immunologiquement pures et une fraction très riche en macroglobulines. Récemment, Biserte, Havez et coll. [13, 73] ont rédigé sur cette question une excellente revue plus complète que les études précédentes, car des contrôles immuno-électrophorétiques systématiques ont été pratiqués qui ont permis l'identification des contaminants. En particulier, le comportement chromatographique de la β_2A-globuline est précisé.

β_2-macroglobuline

L'ultracentrifugation a permis, en 1937, la découverte des anticorps de haut poids moléculaire [76] et est demeurée jusqu'en 1962 la seule méthode utilisable pour la préparation de ces macroglobulines à l'état pur. Les procédés usuels ont fait l'objet d'une revue de Kunkel et coll. [100]. A l'origine on se contentait de soumettre la solution protéique (par exemple le sérum) à une accélération centrifuge intense. A la fin de l'opération on retrouvait au fond du tube une pastille protéique que l'on pouvait séparer du surnageant. Cette pastille contenait les macroglobulines sériques (α_2 et β_2) qui sédimentent plus rapidement, mais était souillée de molécules plus légères qui sédimentent aussi, quoique moins vite. Les fractions du sommet du tube sont toutefois plus

homogènes. Un inconvénient du procédé résulte du fait que cette pastille protéique a été soumise à des accélérations souvent supérieures à 100 000 g : on conçoit que cela puisse entraîner quelque dénaturation. Cet obstacle a été éliminé lorsqu'on a utilisé des cellules spécialement conçues pour le prélèvement à diverses hauteurs du tube. On peut effectuer ces prélèvements à divers temps de centrifugation et cela facilite l'analyse du mélange: il n'en demeure pas moins que dans ce cas encore, les fractions présentes au fond du tube sont des mélanges seulement enrichis en constituants lourds.

L'utilisation de rotors porteurs de godets orientables qui se disposent spontanément dans la direction de l'accélération centrifuge, a permis le calcul des constantes de sédimentation des molécules porteuses d'une activité biologique avec une remarquable précision. L'amélioration décisive de ces procédés est due à Brakke [17] qui a introduit l'ultracentrifugation dans un gradient de densité, pour l'isolement de virus et particules cellulaires. Cette technique a été adaptée par Kunkel [98] à l'isolement des macroglobulines sériques. Le procédé qui a donné le plus de satisfaction, consiste à établir dans le tube un gradient de densité à l'aide de solutions de saccharose allant de 40 % au fond du tube à 10 % au sommet. La meilleure façon d'y parvenir est d'utiliser une chambre de mélange. On dépose ensuite une couche de sérums et rapidement l'ultracentrifugation est mise en route. Toutes ces opérations sont conduites à 4°C. L'ultracentrifugation dure 18 heures à 35 000 t/mn. Les macroglobulines 19S se trouvent vers le fond du tube, tandis que les globulines 7S n'ont que faiblement progressé. Il est possible de récupérer les fractions par un procédé simple qui consiste à percer un trou au fond du tube et à recueillir les gouttes à l'aide d'un collecteur de fractions. Les fractions lourdes sont, avec cette technique, libres de contaminants légers. Il arrive en

revanche, que le cas inverse se produise à un faible degré.

Filliti-Wurmser et Hartmann [51] ont récemment présenté un nouveau procédé : l'ultracentrifugation sur solvant piège qui consiste à introduire au fond du tuge une solution tampon de plus forte densité qui reçoit les molécules lourdes et exclut les légères. Ils ont préféré utiliser des solutions salines; selon eux, le saccharose est à éviter car il peut induire des changements dans les molécules protéiques. Ce procédé conduit à la préparation de macroglobulines très purifiées avec toutefois quelques traces de γ-globuline 7S et ne nécessite pas l'emploi d'un rotor à godets libres, ce qui augmente beaucoup la capacité de l'appareillage.

Ces techniques sont évidemment incapables de distinguer entre les constituants de même densité : c'est dire qu'elles ne permettent pas la séparation des α_2 et β_2-macroglobulines. Celles-ci doivent être séparées par un autre procédé avant ou après l'ultracentrifugation : méthode de précipitation, chromatographie, électrophorèse préparative sont utilisables. On constate également la présence de fractions plus lourdes (28S et 44S en particulier) mais celles-ci semblent bien être à base de β_2-macroglobulines associées. Lorsqu'on veut préparer des β_2-macroglobulines on peut avoir intérêt à enrichir la solution à ultracentrifuger en ces constituants. Une façon simple de le réaliser est de préparer les euglobulines du sérum par dilution et dialyse contre de l'eau distillée ou contre un milieu tamponné de très faible force ionique.

Le principal inconvénient de l'ultracentrifugation est de requérir un appareillage très onéreux.

Ce n'est pas le cas d'une méthode d'introduction toute récente : la *filtration sur gel.* Le gel le plus utilisé jusqu'ici est celui de dextrane, commercialisé sous le nom

de Sephadex. Flodin a écrit une revue générale sur ses utilisations [55].

Le principe de la méthode est le suivant. Une substance capable de former un gel est présentée sous formes de granules de très petite taille. Un gel peut être considéré comme constitué d'un réseau tridimensionnel de molécules fibrillaires hydratées. Si l'on met en présence une solution d'une substance donnée et le gel, deux éventualités peuvent se produire. Si la substance a une taille particulaire bien supérieure aux mailles du gel, elle n'aura aucune tendance à pénétrer dans les granules de gel : on dit qu'elles sont exclues. En revanche, elle circulera librement entre ces granules. Si au contraire, la substance est de petite taille moléculaire, elle pénètrera facilement dans les micro-perles de gel et il existera un équilibre entre les molécules qui ont pénétré dans le gel et celles qui demeureront entre les granules. Si nous préparons une colonne remplie de ce gel particulaire, que nous disposions à son sommet un mélange de ces deux types de molécules, et que nous laissions s'écouler le solvant, il sera facile de voir que les molécules exclues s'écouleront librement avec le solvant, tandis que les molécules qui auront pénétré dans les granules seront retardées dans leur progression par l'existence de l'équilibre auquel nous venons de faire allusion. A la sortie de la colonne, les deux substances apparaîtront séparées, les plus grosses molécules passant les premières. Tel est le principe de la méthode élaborée par Porath [140] et Flodin [55] et appliquée tout d'abord à la séparation de petites molécules. En effet, les premiers granules de gels avaient une maille telle que les protéines étaient automatiquement exclues. Les petites molécules pouvaient être fractionnées sur la base de la difficulté plus ou moins grande qu'elles ont à pénétrer dans le gel (et il est possible que le granule ne soit pas homo-

gène à cet égard) avec en conséquence l'apparition d'un ordre dans l'élution chromatographique. Lorsqu'on fut capable de créer des granules de gel de maille de plus en plus large, il fut possible d'envisager le fractionnement des protéines. Il a été réalisé par FLODIN et KILLANDER [56, 95].

Ceux-ci montrent que le fractionnement chromatographique sur un gel de dextrane particulier (Sephadex G 200) permet une séparation du sérum humain assez analogue à celle de l'ultracentrifugation. Dans un premier pic se trouvent les α_2 et β_2-macroglobulines et les lipoprotéines sériques; dans un second, les γ-globulines, dans un troisième la sidérophiline et l'albumine. Bien que le comportement des lipoprotéines soit différent à l'ultracentrifugation, on voit qu'à ce détail près, cette nouvelle méthode permet de réaliser beaucoup plus économiquement des séparations du même type que celle de l'ultracentrifugation et en quantité beaucoup plus grande. Bien entendu, comme avec cette dernière méthode, il faut pour préparer les β_2-macroglobulines, s'efforcer de séparer par une autre technique les protéines qui sont éluées avec elles.

β_2A-globuline

Il n'existe aucun procédé simple de préparation de ces globulines anticorps. HEREMANS et coll. [80] ont décrit plusieurs méthodes d'isolement basées sur leur solubilité en présence de solutions de sulfate de zinc. Le rendement de ces méthodes est très faible. HAVEZ et coll. [75] ont récemment comparé diverses techniques. Ils préconisent une méthode associant des relargages successifs au sulfate d'ammonium et la chromatographie sur DEAE cellulose. Cette technique permet d'obtenir de la β_2A-globuline pure, mais probablement pas toute la β_2A-globuline du sérum et il n'est pas cer-

tain que, comme pour les γ-globulines, l'échantillon obtenu soit parfaitement représentatif de l'ensemble des molécules possédant cette spécificité immuno-chimique.

Procédé de mise en évidence des immunoglobulines

Ce tour d'horizon permet de constater que le problème de l'isolement des immuno-globulines est encore imparfaitement résolu, particulièrement pour les γ-globulines rapides et la β_2A-globuline. Il est donc nécessaire de recourir à d'autres méthodes pour mettre en évidence le rôle de telle immuno-globuline dans une réaction antigène-anticorps donnée.

Préparation d'anticorps purs

Il s'agit ici de la méthode inverse de celle que nous venons d'envisager qui consiste à préparer des immuno-globulines purifiées et à effectuer ensuite une réaction immunologique. Dans le cas présent au contraire, on réalise la réaction antigène-anticorps (qui doit être une réaction d'agglutination ou de précipitation), on lave le complexe antigène anticorps et on le dissocie par un procédé convenable (l'abaissement du pH aux alentours de 3 ou 4 est un moyen assez général). On peut alors soit chercher à préparer l'anticorps pur ce qui est relativement aisé, si l'antigène est particulaire, soit seulement tenter de l'identifier. A cet égard, les moyens immunochimiques, tels que l'analyse immuno-électrophorétique, paraissent les plus adaptés, mais tout autre procédé peut être employé. Ce type de méthode a été utilisé par Davis et coll. [26] pour l'identification des anticorps de Wassermann dont la nature partiellement macroglobulinique a été reconnue à l'ultracentrifugation. De même, Gordon [66] a préparé simplement des hémagglutinines

actives à froid et a montré par ultracentrifugation qu'il s'agit de macroglobulines. Mehrotra [119] en a réalisé l'identification par voie immuno-chimique. Korngold et coll. [97] ont indiqué une méthode immuno-chimique particulièrement rapide où il n'est même plus nécessaire de préparer le précipité antigène-anticorps. Il s'agit d'un système d'Ouchterlony à trois godets. L'un contient l'antigène, le second le sérum possédant l'anticorps dont on veut identifier la nature, le troisième un antisérum spécifiquement dirigé contre une des trois immuno-globulines. Il suffit d'observer le raccordement du trait de précipitation antigène-anticorps au trait de précipitation sérum anti-immuno-globuline pour identifier cette dernière protéine.

Inhibition de la réaction antigène-anticorps par précipitation spécifique de l'antigène

Un récent travail de Fireman et coll. [54] donne un bon exemple de cette méthode. Ces auteurs cherchent à réaliser des réactions d'anaphylaxie passive par transfert du sérum de malade allergique au derme d'un sujet sain. Par injection d'antigène *in situ* ils obtiennent une réaction anaphylactique. Si le sérum du malade est incubé avec un immum sérum spécifique anti-β_2A-globuline, on n'obtient plus de réaction. Au contraire, des immunsérums spécifiques anti-γ et anti-β_2M-globuline sont sans action. Ces expériences constituent un des arguments invoqués par les auteurs pour faire de la β_2A-globuline le support des réagines allergiques.

Action des réducteurs à fonction thiol sur les anticorps

Deutsch et Morton [35] ont été les premiers à montrer que les composés possédant une fonction thiol (mercapto-éthanol, cystéine) sont capables de dissocier les

macroglobulines en sous-unités. Deutsch et Chan [34], Grubb et Swahn [70] et Fudenberg et coll. [60, 61] vérifièrent l'action de ces composés sur les anticorps macroglobuliniques. Ils ont constaté que ce traitement leur faisait perdre toute activité sérologique. L'abolition d'une activité sérologique par les réducteurs à groupement thiol, serait donc une indication de la nature macroglobulinique de l'anticorps car ces composés sont sans action sur l'activité immunologique des γ-globulines. Toutefois, de récents rapports laissent penser que l'activité sérologique des β_2A-globulines serait également détruite par les réducteurs [148, 54]. L'action du mercapto-éthanol serait donc un test permettant de situer les anticorps parmi les γ ou les autres immuno-globulines.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES EXPERIMENTALES

CHAPITRE 4

CHOIX ET MISE AU POINT DE RÉACTIONS SÉROLOGIQUES DE LA TRYPANOSOMIASE

De nombreuses réactions sérologiques de la trypanosomiase ont été proposées et nous en avons rappelé plus haut les caractères essentiels.

Rappelons que les réactions ayant donné le plus de satisfaction, sont la fixation du complément et sa variante la réaction d'immuno-conglutination.

La réaction de fixation du complément, pratiquée avec un antigène préparé selon la méthode de PAUTRIZEL [131], a été essayée à l'Institut Pasteur de Dakar et a donné des résultats satisfaisants avec certains lots d'antigènes mais non avec d'autres.

La pratique de la réaction est gênée par le fréquent pouvoir anti-complémentaire des sérums. Au reste, la fixation du complément ne convient pas au genre d'étude que nous désirions entreprendre, car les divers types moléculaires d'anticorps possèdent des aptitudes variables à fixer le complément [63].

D'après les premiers résultats de l'immuno-conglutination [11] cette réaction paraît extrêmement sensible avec, en conséquence, un pourcentage élevé de résultats

positifs, qu'il est encore difficile d'interpréter. Nous avons remis son étude à plus tard.

La réaction d'hémagglutination passive a été également essayée à l'Institut Pasteur de Dakar, en utilisant le même antigène fourni par M. le Professeur Pautrizel. Les résultats ont été décevants en raison d'un nombre assez élevé de fausses réactions. Il demeure néanmoins dans nos projets de reprendre cette étude avec de nouveaux antigènes.

Nous avons donc fait porter notre effort dans deux autres directions :

— l'étude de l'inhibition de la respiration de trypanosomes, épreuve décrite par Desowitz [28, 31],

— l'adaptation des techniques utilisant les anticorps fluorescents à la maladie du sommeil. Les résultats satisfaisants obtenus par Fife et Muschel [49] au cours de la trypanosomiase américaine constituaient un encouragement à suivre cette voie.

I. L'épreuve d'inhibition de la respiration des trypanosomes

Ce test a été décrit en 1956 par Desowitz [28] et appliqué à l'étude des anticorps survenant au cours de la trypanosomiase expérimentale à *T. vivax* de bovidés (Zébus et N'dama) [30].

Cet auteur met en présence dans des fioles de Warburg 2 ml de sérum de ces animaux sains ou malades, et environ 100 millions de trypanosomes. Il constate que la consommation d'oxygène des trypanosomes en présence des sérums d'animaux infectés est notablement inférieure à ce qu'elle est avec le sérum normal.

Dans un travail ultérieur [31] il précise sa technique et l'applique à d'autres espèces de trypanosomes et en

particulier à *T. gambiense*. Il constate que la consommation d'oxygène des trypanosomes progresse linéairement en fonction du temps avec des sérums de mouton ou de bovidés sains, alors qu'avec le sérum humain normal elle s'arrête au bout d'une trentaine de minutes et la courbe obtenue prend le même aspect que celle donnée par le sérum d'animaux infectés. Il rapporte cet effet aux propriétés trypanolytiques du sérum humain normal, propriétés mises en évidence depuis les travaux de Laveran [102].

Entretemps, toutefois, Desowitz a publié sommairement quelques essais pratiqués chez dix-huit sommeilleux [29]. Il a détecté la présence d'anticorps chez dix-sept sujets, quoique parfois à des taux très faibles.

Ainsi, bien qu'il existe spontanément dans le sérum humain un pouvoir naturel d'inhibition du métabolisme des trypanosomes, il paraissait possible de mettre en évidence un pouvoir inhibiteur acquis au cours de l'infection.

Ceci nous a incité à reprendre les expériences de Desowitz [113, 114].

1° *Essais en présence de sérum humain normal*

A. *Matériel :*

Nous avons utilisé l'appareil de Warburg modèle S de la maison Braun (Melsungen, Allemagne) équipé de fioles de 15 ml. Le thermostat était réglé à 36,5°C selon les indications de Desowitz.

B. *Suspension de trypanosomes :*

Les trypanosomes proviennent d'une souche de *T. gambiense* (souche Lariviere) maintenue depuis 7 ans par passage sur *Cricetomys gambianus* Waterhouse (*).

(*) Encore dénommé « rat de Gambie ».

selon le procédé de cet auteur [101]. La séparation des trypanosomes à partir du sang citraté de *Cricetomys*, se fait par centrifugation différentielle. Une première centrifugation de 5 minutes à 50 g, permet de séparer un culot globulaire et un surnageant riche en trypanosomes. Ce culot est repris en sérum physiologique et centrifugé à nouveau à 50 g pendant 5 minutes. Les deux surnageants sont alors rassemblés et centrifugés 10 minutes à 600 g. On obtient un culot blanchâtre constitué presque uniquement par des trypanosomes. Nous avons réalisé une suspension titrant approximativement 5.10^8 trypanosomes/ml, selon les indications de Desowitz [31] à ceci près que la suspension a été faite dans le liquide de Hanks au lieu de sérum physiologique.

C. *Conduite des expériences :*

Nous avons légèrement modifié les conditions de Desowitz pour les adapter au matériel en notre possession.

Chaque fiole reçoit :

— dans la coupelle centrale : 0,1 ml de KOH à 20 g p. 100 ml,

— dans la fiole proprement dite :

0,15 ml de la suspension de trypanosomes,
0,25 ml de glucose à 4 g p. 100 ml,
1 ml de sérum humain normal frais.

Les fioles séjournent 15 minutes dans le bain pour laisser les températures s'égaliser, puis on ferme les manomètres. Les lectures sont faites de 10 en 10 minutes pendant une heure.

D. *Résultats :*

Nos premiers essais n'ont pas confirmé les résultats de Desowitz [31] : la courbe de la consommation d'oxygène en fonction du temps a été parfaitement rectiligne

(fig. 1). Cette méthode ne nous a donc pas permis de déceler simplement, au bout de 60 minutes et avec la souche utilisée, un pouvoir trypanolytique du sérum humain normal. Ce résultat n'est pas isolé : nous l'avons vérifié sur un mélange de 30 sérums normaux et sur plus de 50 sérums individuels.

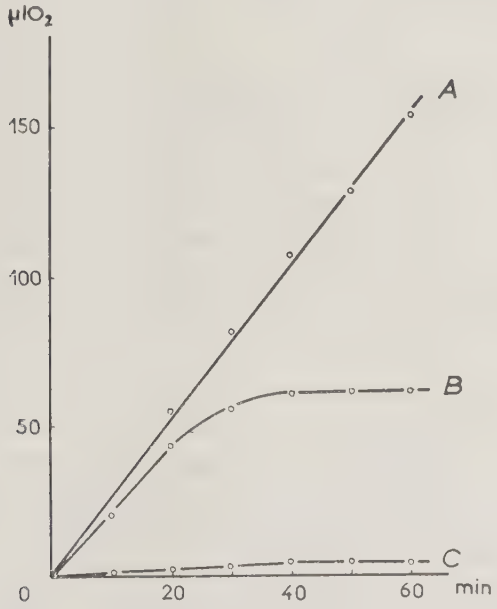


FIG. 1
Consommation d'oxygène d'une suspension de **T. gambiense** en présence de :

en A = sérum humain normal.
en B = liquide de Hanks seul.
en C = sérum de trypanosomé.

Bien au contraire, le sérum manifeste une action favorisante sur le métabolisme respiratoire des parasites. Si l'on remplace le sérum par du liquide de Hanks, ou du sérum physiologique, la respiration diminue fortement, puis s'arrête en 30 ou 40 minutes (fig. 1).

Cet effet persiste après conservation du sérum pendant plusieurs mois, après chauffage à 56°C, après une série de congélations et de décongélations. C'est, qu'en tout état de cause, il ne paraît pas lié aux protéines sériques : en effet, un sérum dialysé exhaustivement contre du sérum physiologique, perd ce pouvoir eutrophique. La courbe obtenue a l'allure générale de celle faite en présence de liquide de Hanks (fig. 1). En revanche, l'ultrafiltrat (*) de sérum est aussi actif que le sérum lui-même. Il est donc vraisemblable que les trypanosomes trouvent dans le sérum humain un principe nutritionnel de faible poids moléculaire. Cette observation s'accorde bien avec les résultats de Harvey sur *T. hippicum* [72].

Des essais préliminaires paraissent indiquer qu'il ne s'agit pas d'oligo-éléments : l'addition à la suspension de trypanosomes d'une solution de micro-éléments du type de celles employées pour les cultures des champignons inférieurs, n'a pas favorisé sa respiration. Il ne semble pas s'agir davantage des vitamines les plus classiques, comme le montre la même expérience réalisée avec un soluté polyvitaminique commercial. Nous n'avons pour l'instant pas davantage poussé les recherches dans cette direction.

Nous avons recherché la quantité minima utile de sérum normal. En réalisant des mélanges de liquide de Hanks et de sérum à volume total constant, nous avons pu constater que la consommation d'oxygène n'augmente plus sensiblement au delà de 0.3 ml de sérum.

Cependant de récentes expériences faites avec des quantités plus fortes de trypanosomes, montrent que 0.3 ml de sérum ne sont plus suffisants. Il semble donc exister une relation entre la quantité de facteurs essentiels apportés par le sérum et la quantité totale d'oxy-

(*) La technique de l'ultrafiltration est rapportée au chapitre 5, page 115.

gène consommée. Lorsque celle-ci est de l'ordre de 150 µl, 0,3 ml de sérum suffisent. Mais si cette consommation double, il faut aussi doubler l'apport de sérum. Il n'est du reste pas certain que tous les sérums aient le même pouvoir activateur.

2° *Essais en présence de sérum de trypanosomés.*

A. *Remplacement du sérum humain normal par du sérum de trypanosomés :*

De premiers essais nous ont montré que dans ces conditions la respiration des parasites était beaucoup moins intense, ce qui constitue l'indice de la présence d'anticorps spécifiques. Ces résultats encourageants nous ont amené à explorer l'influence de diverses variables en vue d'établir un protocole standard.

B. *Action du complément :*

On sait que la présence de complément est indispensable à l'accomplissement de plusieurs réactions immunologiques : il fallait donc étudier ce point.

— *Etude de la décomplémentation.* — Lorsque le sérum est chauffé pendant 30 minutes à 56°C. on constate une diminution du pouvoir inhibiteur (fig. 2). Si l'on y ajoute 0,2 ml de sérum humain frais, on ne rétablit que partiellement le pouvoir inhibiteur; ce qui évoque à la fois l'intervention du complément et une dénaturation partielle des anticorps.

— *Addition de complément.* — Comme les sérums de malades ne nous arrivent pas toujours frais et en raison de leur fréquent pouvoir anticomplémentaire mentionné plus haut, nous avons recherché l'effet d'un apport de complément.

Dans un premier temps, nous avons eu recours au clas-

sique sérum de cobaye. Celui-ci a induit une inhibition non spécifique, puisqu'elle se produisait en présence de sérum humain normal. Dans nos conditions opératoires, le sérum de cobaye possède donc la même activité trypa-

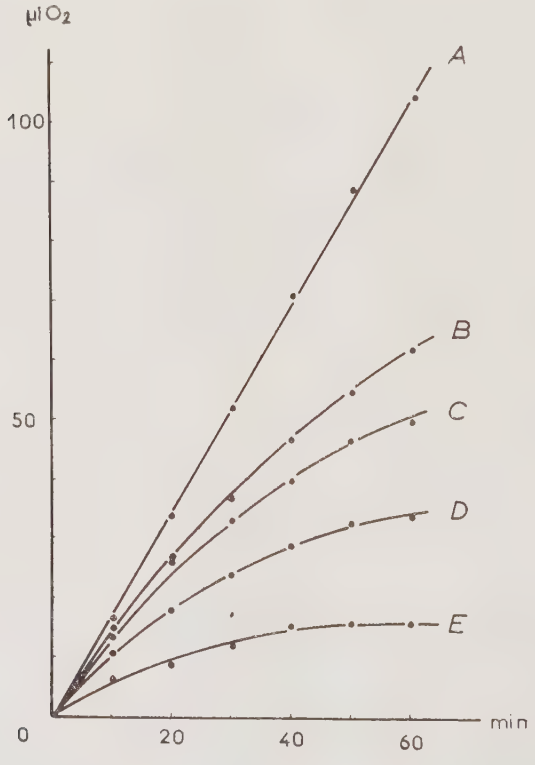


FIG. II

Consommation d'oxygène d'une suspension de **T. gambiense** en présence de :

en A = sérum humain normal.
en B = sérum de trypanosomé ayant séjourné trente minutes à 56° C.
en C = sérum du même malade également chauffé à 56° C, trente minutes, additionné de sérum humain normal frais.
en D = sérum du même malade, non chauffé.
en E = sérum du même malade, non chauffé, additionné de sérum humain normal frais.

nolytique que celle décrite par Desowitz au sujet du sérum humain.

Nous avons donc été conduit à nous servir de sérum humain frais comme source de complément. Nous avons alors constaté que le pouvoir inhibiteur des sérums de malades s'en trouvait nettement renforcé (fig. 2).

Aussi avons-nous adopté comme règle d'ajouter toujours du sérum humain frais.

C. *Quantité de trypanosomes :*

Cherchant à établir la quantité optimale de trypanosomes, nous avons préparé une expérience où les trypanosomes se trouvaient en quantité variable soit 0,20, 0,15 ou 0,10 ml de la suspension initiale. Avec le sérum normal nous avons observé que la respiration était, comme on pouvait s'y attendre, fonction du nombre de trypanosomes introduits dans la fiole. Cependant les consommations d'oxygène ne sont pas proportionnelles à ces nombres. Ainsi, pour 0,20 ml de la suspension la consommation est de 225 μl O_2/heure, tandis que 0,10 ml n'utilisent que 63 μl/heure. La proportionnalité paraît se rétablir dès que les chiffres absolus de consommation d'oxygène sont suffisamment élevés, soit d'après notre expérience, au-dessus de 150 μl. Ainsi, 0,15 ml de la même suspension ont consommé 155 μl d'O_2/heure. Les rapports des consommations aux quantités sont ici sensiblement identiques :

$$\frac{225\ \mu l}{0{,}20} = 1125\ \mu l\ O_2\ /\text{ml susp.} \# \frac{155\ \mu l}{0{,}15} = 1033\ \mu l\ O_2/\text{ml susp.}$$

tandis qu'on avait avec 0,10 ml :

$$\frac{63\ \mu l}{0{,}10} = 630\ \mu l\ O_2/\text{ml suspension.}$$

Ces résultats ont été confirmés à plusieurs reprises et

nous ont conduit à préférer la quantité de 0,15 µl de suspension de trypanosomes (à environ 5.10^8 trypanosomes/ml) qui donne les résultats les plus interprétables.

D. *Quantité de sérum à tester :*

Pour des raisons de simple économie, nous avons désiré opérer avec la plus petite quantité possible de sérum : un ml nous ayant donné des résultats satisfaisants, nous n'avons pas recherché l'effet de doses plus élevées. En revanche, nous avons étudié l'effet de la dilution du sérum de malade.

Dilutions dans le liquide de Hanks en suivant le protocole standard. — Aux faibles dilutions (de l'ordre du 1/10 ou moins) les taux d'inhibition ne diffèrent guère de ceux obtenus avec le sérum pur. Ils diminuent lorsqu'on dilue plus fortement. Il semble alors exister une sorte de palier. Ainsi, le sérum n° 30 dont la consommation d'O_2 était de 58 µl O_2/heure utilisait aux dilutions allant du 1/50 au 1/400 des volumes variant de 135 µl à 112 µl O_2/heure. Dans ces conditions, le témoin consommait 324 µl O_2/heure.

Dilutions dans le sérum normal. — Nous avons signalé plus haut que la quantité de 0,3 ml de sérum humain normal paraissait insuffisante à assurer les besoins nutritifs d'une suspension de trypanosomes lorsque celle-ci est riche. On pouvait donc se demander si la faible consommation d'oxygène observée en présence de sérum de sommeilleux très dilué n'était pas due simplement à une carence en facteurs essentiels. Pour éliminer cette hypothèse nous avons réalisé l'expérience suivante : le même sérum de malade a été dilué au 1/100, d'une part dans du liquide de Hanks et d'autre part dans du sérum normal. Deux fioles témoins conte-

naient l'une un sérum normal à la dose de 1,3 ml, l'autre 1 ml de liquide de Hanks et 0,3 ml de sérum humain normal. Soulignons que toutes ces fioles contenaient la quantité minimum de 0,3 ml de sérum humain normal. En outre, nous avons ajouté une fiole ne contenant que du liquide de Hanks. Les résultats de cette expérience sont indiqués dans la figure 3.

Cette expérience montre que le sérum du malade dilué au 1/100 inhibe la respiration des trypanosomes. En effet, la fiole correspondante n'utilise que 52 μl O_2/h, alors qu'une fiole contenant du liquide de Hanks à la place de ce sérum dilué, consomme 146 μl O_2/heure. A notre surprise, le même sérum pathologique dilué au même taux dans du sérum normal, consomme 179 μl O_2/heure ce qui se rapproche de la consommation de la fiole témoin contenant 1,3 ml de sérum normal (228 μl O_2/heure). Nous discuterons plus loin l'interprétation possible de ces résultats.

3° *Causes d'erreurs dues à des facteurs toxiques*

Nos premières expériences à l'appareil de Warburg nous ont donné des résultats décevants en raison des faibles consommations d'oxygène relevées. Nous avons pu en déceler l'origine toxique : lorsque nous avons remplacé la graisse aux silicones destinée à assurer l'étanchéité du système par de la lanoline, les consommations d'O_2 sont devenues normales.

Un problème pratique fréquent, en raison de l'origine souvent lointaine des sérums que nous avons étudiés, est celui de la protection de ces sérums contre les contaminations bactériennes. Il aurait été commode de pouvoir y ajouter un antiseptique puissant comme le merthiolate ou l'azide de sodium. Malheureusement, ces produits inhibent fortement la respiration des trypanosomes. Il n'est pas possible d'éliminer entièrement le mer-

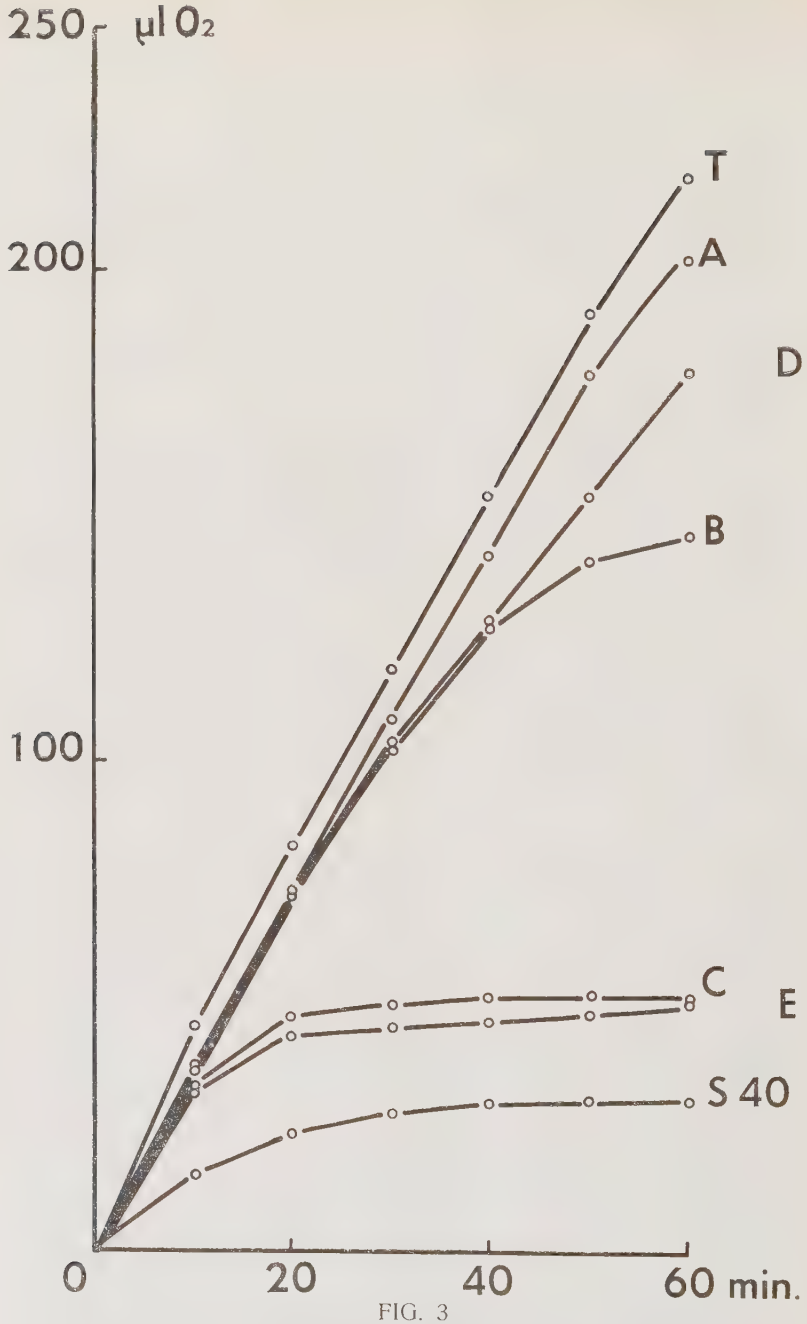


FIG. 3

Expériences sur l'effet de la dilution du sérum dans divers milieux :

T = Sérum normal (1,3 ml).
S.40 = Sérum de Trypanosomé DK 40 (1 ml) + 0,3 ml sérum normal.
A = Liquide de Hanks 0,8 ml + sérum normal 0,5 ml.
B = Liquide de Hanks 1 ml + sérum normal 0,3 ml.
C = Liquide de Hanks pur.
D = Sérum DK 40 dilué au 1/100e dans du sérum normal.
E = Sérum DK 40 dilué au 1/100e dans du liquide de Hanks + 0,3 ml de sérum normal.

thiolate par dialyse du sérum. Nous avons donc dû renoncer à utiliser ces substances.

Dans le même ordre d'idée, nous avons vérifié que le tri-hydroxy-méthyl-amino-méthane, que nous avons employé au cours de la préparation de fractions protéiques anticorps, ne possède pas d'activité toxique sur les trypanosomes aux doses où nous l'avons utilisé.

4° *Protocole standard*

Ces essais préliminaires nous ont conduit à adopter comme règle le protocole expérimental suivant :

A. *Conduite des expériences :*

Chaque fiole reçoit les réactifs suivants :

— 0,15 ml de la suspension de trypanosomes,
— 0,25 ml d'une solution de glucose à 4 g p. 100 ml,
— 1 ml de sérum à tester (non-chauffé),
— 0,3 ml de sérum humain frais comme source de complément.

Le godet central contient toujours 0,1 ml de potasse à 20 g p. 100 ml. Les fioles séjournent quinze minutes dans le bain pour laisser les températures s'égaliser, puis on ferme les manomètres. Les lectures sont faites de 10 en 10 minutes pendant 1 heure.

B. *Expression des résultats :*

On définit un indice d'inhibition faisant intervenir la consommation d'oxygène des trypanosomes dans les fioles de Warburg contenant respectivement le sérum de sujet malade et celui d'un témoin normal.

$$\text{Indice d'inhibition} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

où A = consommation en μl O_2/heure des trypanosomes en présence de sérum témoin,

B = consommation en μl O_2/heure des trypanosomes en présence du sérum à examiner.

Ce même nombre est appelé : index d'anticorps par Desowitz [30].

Le tableau I rassemble les résultats obtenus sur :

— 80 sérums de malades atteints de trypanosomiase africaine à *T. gambiense* au stade encéphalitique, à quelques exceptions près. Le diagnostic est assuré par la découverte du parasite,

— 28 sérums pathologiques de sujets non trypanosomés.

Nous avons spécialement étudié les sérums riches en β_2-macroglobuline, car ce sont évidemment ceux qui présentent les déséquilibres protidiques les plus proches de ceux observés chez les trypanosomés. Dans ce groupe, il faut isoler une série de 16 sujets vivants dans une zone d'ancienne endémicité sommeilleuse.

Chaque expérience a été conduite par comparaison avec les sérums de sujets sains. Nous avons ainsi étudié 50 sérums normaux. L'un de ces sérums résulte du mélange à parties égales de 30 sérums normaux.

Nous n'avons pas toujours pu disposer de sérum frais: 40 sérums de malades avaient été conservés de 1 à 6 mois de — 20°C à — 60°C. Sept sérums étaient stockés depuis plus de 6 mois dans les mêmes conditions.

On sait que la trypanosomiase entraîne d'importantes altérations du liquide céphalo-rachidien et en particulier une importante hyper-protéinorachie où Mattern [116] a pu mettre en évidence la part de la β_2-macroglobuline. Cet auteur pense que cette protéine est sécrétée au niveau des méninges et il était donc intéressant d'étudier le L.C.R.

Nous avons donc pratiqué l'épreuve sur sept L.C.R. répartis comme suit :

	Nombre de sérums donnant un indice d'inhibition de :										
	Nombres	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100
Sérums de trypanosomés datant de moins de 6 mois	62	3						9	14	27	9
Sérums de trypanosomés conservés depuis plus de 6 mois	7	3		1	1	1	1				
Trypanosomiase en cours de traitement ..	3							2	1		
Trypanosomiale traitée, guérie cliniquement depuis 6 mois ou plus	8	1	2	1						4	
Trypanosomiase clinique sans preuve parasitologique	3									3	
L.C.R. de trypanosomés	4		1	1					1	1	
L.C.R. non trypanosomés	3	2	1								
Sérums pathologiques non trypanosomés riches en β_2M-globuline	12	11			1						
Sérums riches en β_2M-globuline de sujets non trypanosomés mais vivant dans une région d'ancienne endémie	16	5	4	4	3						
Normaux	50	50									

TABLEAU I

Indices d'inhibition de la respiration de trypanosomes obtenus avec des sérums et des L.C.R. de diverses origines.

— 4 L.C.R. de trypanosomés,

— 3 L.C.R. pathologiques, mais prélevés sur des sujets indemnes de trypanosomiase.

Ces L.C.R. ont été préalablement concentrés par des méthodes diverses : pervaporation en boyau de cellophane, lyophilisation, ultrafiltration sous vide.

5° *Discussion*

Nos résultats appellent des commentaires de plusieurs ordres. En premier lieu, il serait utile d'expliquer la contradiction entre nos résultats et ceux de Desowitz qui dans une récente publication [31] fait allusion au pouvoir trypanolytique du sérum humain normal. En second lieu, il convient de discuter la valeur de notre procédé. Enfin, nos résultats soulèvent des problèmes physio-pathologiques importants dans le domaine de la trypanosomiase.

A. *Action du sérum normal sur les trypanosomes :*

Dans nos conditions expérimentales, le sérum humain normal possède un net effet activateur de la respiration des trypanosomes, et nous n'avons jamais relevé de courbes semblables à celle de Desowitz. Les expériences d'ultrafiltration montrent que cet effet activateur est lié à de petites molécules traversant la membrane de cellulose : il s'agit vraisemblablement de facteurs essentiels pour le métabolisme du trypanosome. Cependant il est hors de doute que le sérum humain normal possède une activité trypanolytique. Dès 1902, Laveran [102] avait constaté que du sérum humain normal a un effet net sur l'évolution des trypanosomiases expérimentales chez l'animal. Yorke, Adams et Murgatroyd [198] confirment, en 1930, cette activité trypanocide *in vitro*, jusqu'à des dilutions du 1/5 000 au 1/25 000. Au cours de

certaines affections hépatiques, l'activité trypanocide disparaît. Le sérum humain normal n'affecte pas les souches polymorphes de *T. gambiense* ou *rhodesiense*. Ces auteurs y voient un mécanisme possible de l'adaptation de ces parasites à l'hôte humain. Cependant, ces organismes deviennent sensibles à l'action trypanocide du sérum normal, après passages répétés sur animal de laboratoire.

Terry [178] a vu que le rat du coton possède également un principe trypanolytique naturel, et par fractionnement chromatographique, démontré qu'il s'agit d'une γ-globuline.

En revanche, Desowitz [30] n'a pas retrouvé cette activité chez les bovins « N'dama » qui sont pourtant naturellement résistants à la trypanosomiase. Rappelons ici, que dans nos essais, le sérum de cobaye s'est montré fortement inhibiteur.

Toutefois, une apparente anomalie de nos expériences nous a conduit à évoquer l'existence d'un faible pouvoir inhibiteur du sérum humain normal, non évident au vu des courbes: il s'agit de l'absence de proportionnalité des consommations d'oxygène en fonction du nombre de trypanosomes que nous avons mentionné plus haut. Ceci peut être interprété si l'on admet que le sérum humain normal détruit une quantité fixe et relativement faible de trypanosomes. Nous inspirant des résultats de Terry et de nos propres essais sur l'ultrafiltrat de sérum humain normal, nous avons cherché à dissocier les principes inhibiteurs et activateurs du sérum normal. Comparant la respiration d'une suspension de trypanosomes en présence de sérum humain normal et de l'ultrafiltrat de ce même sérum, nous avons constaté un certain effet inhibiteur du sérum, puisque les consommations ont été respectivement de 158 et 188 μl O_2/heure. Nous avons répété deux fois ce type d'expérience. Dans un cas, le

résultat précédent a été confirmé, dans l'autre il ne semblait pas exister de pouvoir inhibiteur.

Ainsi avons-nous probablement retrouvé ce pouvoir trypanolytique décrit par de nombreux auteurs. Il n'en demeure pas moins que dans nos conditions expérimentales cet effet est sans commune mesure avec celui observé par Desowitz. Augmentant les quantités de sérum pour nous placer dans les mêmes conditions que cet auteur, nous n'avons pas davantage retrouvé ses résultats.

Une hypothèse peut être avancée pour expliquer la divergence de ces expériences : la nature différente des souches ayant servi de source de trypanosomes; cette différence peut provenir de la qualité initiale de la souche ou des modifications qu'ont pu entraîner les passages sur cet hôte inhabituel qu'est le *Crycetomis gambianus*.

Sur le plan pratique, une conclusion s'impose : dans nos conditions expérimentales, le pouvoir inhibiteur du sérum humain normal est si faible qu'il ne gêne en rien la mise en évidence du pouvoir anticorps acquis.

B. *Pouvoir inhibiteur des sérums de trypanosomés :*

La discussion de la valeur de ce test d'inhibition respiratoire doit porter sur deux points : reproductibilité et sensibilité.

Reproductibilité. — La quantité d'oxygène consommée par les trypanosomes en présence de sérum de malade est relativement fixe, dépendant assez peu de la richesse de la suspension. Nous n'avons pas jusqu'ici cherché à élucider les causes de ce phénomène. Il en résulte que le taux d'inhibition dépend fortement de la quantité d'oxygène consommée au niveau de la fiole témoin. L'expérience nous a montré qu'on ne peut attacher de valeur aux résultats que lorsque la consommation du témoin

avoisine ou dépasse 150 µl O_2/heure. Dans ces conditions, la reproductibilité est assez satisfaisante, comme le montre le tableau II rapportant des expériences pratiquées séparément. On voit que l'écart est généralement inférieur à 10 %, ce qui est honorable pour une méthode biologique. Nous avons conservé l'indice d'inhibition de 65 pour le sérum Dakar 24 à titre d'exemple, car précisément cette valeur a été obtenue avec une suspension de trypanosomes insuffisamment riche qui, avec le sérum témoin, n'a consommé que 100 µl. En cas de discordance entre deux indices d'inhibition, il est préférable de conserver la valeur obtenue dans l'expérience où la fiole témoin a eu la plus forte consommation d'oxygène.

Il serait satisfaisant pour l'esprit de rapporter la consommation d'oxygène à une quantité fixe de trypanosomes. Ce qui précède, montre que cela n'introduirait aucune précision supplémentaire, bien au contraire.

SÉRUMS	INDICES D'INHIBITIONS			
Sindiogou 11.	70	73		
Dakar 24.	65	78	83	
Souhoua 38.	75	83		
Dakar 30.	78	87		
Sindiougou 21.	80	87		
Bobo-Dioulasso 40/62.	84	85		
Dakar 31.	84	93		
Dakar D/523.	93	94		
Dakar 10.	90	97	97	98

TABLEAU II - Reproductibilité des résultats (voir le texte)

Sensibilité et fidélité du test. — Jusqu'ici le test ne nous a donné aucune fausse positivité, c'est-à-dire qu'aucun sérum de sujet normal ou de malade atteint d'une affection autre que la trypanosomiase, n'a donné lieu à une diminution nette de la respiration de la souche.

En revanche, nous avons observé trois cas de négativité complète chez d'authentiques trypanosomés: on ne peut les expliquer par la baisse d'activité des anticorps qui survient dans les échantillons vieillis, car il s'agissait de sérums récemment prélevés. Pour deux de ces sérums, la négativité de notre test allait de pair avec ce qu'on peut considérer comme une anomalie dans le cadre de la trypanosomiase : l'absence d'élévation du taux de la β_2-macroglobuline sérique, jugée à l'analyse immuno-électrophorétique. Peut-être s'agissait-il chez ces malades d'un syndrome apparenté à celui du manque d'anticorps.

Pour le troisième malade, le taux de la β_2-macroglobuline était, comme il est de règle en pareil cas, anormalement élevé. La négativité du test tient peut-être à la singularité antigénique de la souche infectante. Cette hypothèse est admissible, mais toutefois, jusqu'ici le test n'a pas paru sensible à l'origine géographique des sérums : nos malades se trouvaient, en effet, au Sénégal dans deux régions très différentes : la savane des environs de Dakar et la forêt de Casamance; d'autre part, beaucoup de sérums provenaient de la Haute-Volta. S'il est vraisemblable que les caractères antigéniques des souches varient d'une région à l'autre, il semble néanmoins que dans nos conditions de travail, les antigènes utiles sont ceux de l'espèce, plus que des antigènes facultatifs caractéristiques des diverses souches. Nous n'avons donc aucune explication de la défaillance complète du sérum de ce malade a inhiber le métabolisme des trypanosomes.

Opérer sur des sérums prélevés depuis longtemps constitue une cause d'erreur. Il semble que la conservation prolongée diminue le pouvoir anticorps. La température de — 20°C n'empêche pas cette lente altération qui n'est vraiment sensible qu'après six mois, comme le montre le tableau I.

Le traitement paraît avoir agi sur le taux d'anticorps de façon très différente chez les quatre malades observés, bien que les cas soient relativement comparables. Ceci devrait faire l'objet d'une étude spéciale sur un échantillon suffisant.

Un point assez remarquable est que les sérums provenant d'un village de Haute-Volta où existait une endémie sommeilleuse il y a une quinzaine d'années (et où l'on n'a plus dépisté de malade nouveau depuis ce temps) présentent presque tous un faible pouvoir inhibiteur. Faut-il y voir la trace d'infestations anciennes à minima, n'ayant pas abouti à une véritable maladie ? L'hypothèse mérite d'être soulevée. Elle concorde en tout cas avec l'opinion de Manson-Bahr : « Il ne fait pas de doute que lorsque la maladie a persisté depuis longtemps dans une certaine zone, les habitants y montrent un degré de résistance que l'on ne rencontre pas dans les régions plus récemment atteintes » [111].

Cette épreuve paraît donc suffisamment reproductible et fidèle. Comme base d'interprétation clinique, nous admettons provisoirement que des indices d'inhibition de 60 à 100 signifient la présence d'anticorps : le test est positif. De 40 à 60 le test est probablement positif. Nous n'avons pas encore suffisamment de corrélations cliniques pour interpréter les indices allant de 10 à 40. En dessous de 10, nous nous trouvons dans la marge d'erreur de la méthode.

C. *Rôle des constituants du sérum normal dans la réaction d'inhibition de la respiration des trypanosomes.*

Nous avons déjà eu l'occasion de discuter le rôle des constituants ultrafiltrables du sérum humain normal et nous n'y reviendrons pas ici. Dans la réaction antigène-anticorps, nous avons pu mettre en évidence deux facteurs supplémentaires :

— le complément dont le rôle est classique. Nous avons rapporté plus haut des expériences montrant qu'il favorise médiocrement la réaction d'inhibition;

— le sérum humain normal contient en outre, un facteur diminuant très fortement la réaction d'inhibition lorsqu'on la pratique sur un sérum de malade dilué (cf. fig. 3). Dans nos conditions habituelles d'expérience où les fioles ne contenaient que 0,3 ml de sérum humain normal, cet effet passe inaperçu. Mais si la dilution du sérum pathologique est faite dans du sérum humain normal, il devient prédominant. Un tel effet inhibiteur du sérum normal n'est pas neuf en immunologie. Dans son traité, Boyd [16] en rapporte deux exemples. Ainsi, la floculation d'un mélange ovalbumine-anti-ovalbumine de lapin est retardée si la dilution est faite dans du sérum de lapin normal à la place de sérum physiologique [83]. De même, Hooker [82] rapporte que le sérum de cheval normal retarde considérablement la précipitation d'un mélange hémocyanine-anti-hémocyanine de cheval. Avec un autre système immunologique, Ovary et Bier [127] montrent que les anticorps de lapin dilués dans du sérum de lapin normal sont beaucoup moins actifs pour la production d'anaphylaxie cutanée passive que lorsque la dilution est faite dans du sérum physiologique. Binaghi, Halpern et Liacopoulos [12] ont montré que ce même effet est obtenu lors de la réaction d'ana-

phylaxie passive de l'intestin isolé de cobaye, qu'il est dû à des γ-globulines, et fonction de leur quantité dans le milieu.

Il apparaît donc que le sérum humain normal que nous ajoutons, a un rôle complexe, à la fois utile et néfaste à la mise en évidence de la réaction antigène-anticorps. Nous pensons orienter nos futures recherches vers la dissociation de ces divers effets. L'effet nutritionnel peut être obtenu avec l'ultrafiltrat de sérum ou des équivalents à éprouver, comme par exemple le liquide amniotique. En revanche, il sera certainement plus difficile d'apporter du complément sans simultanément faire intervenir ces facteurs gênant la réaction antigène-anticorps.

D. *Signification de l'inhibition de la respiration des trypanosomes.*

Le test d'inhibition de la respiration des trypanosomes paraît donc assez satisfaisant sur le plan théorique. Comme le fait remarquer Desowitz [31] il a l'avantage de mettre en évidence l'effet global des anticorps sur les trypanosomes vivants. Ces conditions se rapprochent plus de l'état biologique du parasite que celles des tests sérologiques pratiqués à l'aide d'antigènes dont on peut toujours craindre la dénaturation.

Malheureusement, il est inapplicable à la pratique courante, puisqu'il nécessite la disposition d'une souche de trypanosomes entretenue sur l'animal de laboratoire, d'un appareil de Warburg et bien entendu du personnel qualifié pour sa manipulation. Il constitue cependant, croyons-nous, un procédé de valeur pour les recherches sur la trypanosomiase.

On pouvait craindre que son application soit limitée par l'existence bien connue de nombreuses variétés anti-

géniques des trypanosomes. Ces variations sont de deux ordres :

— on sait d'une part que les formes isolées chez les patients sont remarquables par leur caractère polymorphe. Ce caractère se perd par passage répété sur l'animal de laboratoire : la souche est devenue alors monomorphe : ceci correspond à des modifications antigéniques,

— il existe, d'autre part, des variations antigéniques d'une souche naturelle polymorphe à une autre, comme cela se voit chez d'autres micro-organismes.

Desowitz [31] a montré que chez le mouton le test d'inhibition respiratoire permet de mettre en évidence de profondes différences antigéniques entre souche monomorphe et souche polymorphe. Ainsi, un sérum immun contre *T. rhodesiense* polymorphe inhibe totalement (index d'anticorps = 98,5) la souche homologue. En revanche, la souche monomorphe correspondante donne un index de 16 seulement. La contre-expérience avec le sérum d'un animal infecté par une souche monomorphe de la même espèce, montre qu'il inhibe fortement cette souche (index = 87,5) tandis que l'index n'est que de 14 avec la souche polymorphe.

Nos conditions étaient comparables à celles de cette expérience puisque le sérum des malades peut être considéré comme un immun-sérum anti-souche polymorphe de *T. gambiense* et que nous nous servons pour conduire le test d'une souche monomorphe. Selon les résultats de Desowitz [31] on aurait pu s'attendre à n'obtenir que de faibles indices d'inhibition . Le même tableau 1 montre qu'il n'en est rien. L'explication la plus plausible fait appel à la nature antigénique particulière de la souche Lariviere de *T. gambiense*. Il faut souligner l'extrême virulence de cette souche qui tue le rat de Gambie en trois jours, et s'est révélée très pathogène chez le singe.

D'autre part, nous avons déjà attiré l'attention sur le fait que nos sérums proviennent de trois régions fort éloignées les unes des autres, ce qui rend probable les différences antigéniques d'une souche polymorphe à une autre. Ceci ne paraît pas avoir eu d'influence néfaste, ce qui confirme le point de vue de Desowitz selon lequel cette épreuve met en évidence des anticorps spécifiques d'espèce plutôt que de souche.

Nos résultats montrent qu'il existe généralement dans le sérum des trypanosomés un fort pouvoir anticorps, se manifestant par une profonde diminution du métabolisme et éventuellement, ainsi que nous l'avons vérifié; par la lyse du parasite. Si ces propriétés du sérum se manifestent aussi intensément *in vivo* qu'*in vitro*, on comprend mal que la trypanosomiase humaine ne soit pas spontanément curable.

Trois hypothèses se présentent à l'esprit :

— l'anticorps n'a pas la même efficacité *in vivo* qu'*in vitro* par suite de la présence d'éventuels facteurs inhibiteurs,

— le trypanosome échappe partiellement *in vivo* à l'action de l'anticorps, soit parce qu'il se trouve inaccessible, soit parce qu'il existe des processus adaptatifs lui permettant de vivre en présence d'anticorps. Ainsi on peut imaginer l'apparition d'enzymes adaptatifs détruisant ces anticorps (comme la pénicillinase bactérienne inactive la pénicilline environnante),

— la présence des anticorps dans le milieu favorise des processus de sélection de souches résistantes aux anticorps et apparues par mutation. Le caractère fortement mutagène des trypanosomes, mis depuis longtemps en évidence [147], donne du poids à cette hypothèse. Il y aurait donc des souches de rechute, résistantes aux anticorps [104].

Beaucoup d'études restent à entreprendre avant de pouvoir choisir entre ces hypothèses ou en présenter de nouvelles sur cet important problème biologique et physio-pathologique.

II. Essai de mise en évidence des anticorps par immuno-fluorescence

Parallèlement au test respirométrique, nous avons tenté de mettre au point une technique de mise en évidence des anticorps par immuno-fluorescence.

C'est une technique déjà classique bien que récente et d'application relativement aisée, ce qui la rendrait précieuse en pratique pour le diagnostic de l'affection. Jusqu'ici cependant, elle n'a pas été appliquée au cas de la trypanosomiase africaine.

En outre, cette technique paraît applicable à l'étude du pouvoir anticorps des diverses immuno-globulines. Théoriquement, en effet, on peut recourir dans ce but :

— à la méthode directe de marquage qui consiste à fixer le produit fluorescent sur des γ, des β_{2A}- ou des β_{2M}-globulines préalablement isolées et purifiées à partir de sérum de malade et à les mettre en présence d'un antigène trypanosomien;

— à la méthode dite du « sandwich ». Elle consiste à laisser la réaction antigène-anticorps se faire entre une suspension de trypanosomes et les anticorps contenus dans le sérum du malade. La présence de ces anticorps fixés sur les parasites, est ensuite révélée par l'addition d'un sérum anti-immuno-globulines humaines conjugué à un composé fluorescent. On a la faculté d'utiliser au cours de ce temps des conjugués faits avec des anti-

sérums spécifiques anti-β_{2A}-, anti-β_{2M}- ou anti-γ-globulines.

Nous avons été encouragés dans cette voie par des travaux récents réalisés sur *T. cruzi*. Fife et Muschel [49] ont décrit une technique qui leur a donné satisfaction pour le diagnostic de la trypanosomiase américaine. Ils utilisent la fraction euglobulinique d'un sérum de cheval anti-γ-globuline humaine, conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine. Leur antigène est une suspension formolée de *T. cruzi*, préparée à partir de culture de trypanosome, de façon à contenir 10^7 trypanosomes par ml. La réaction est conduite en tubes, puis une goutte du culot est placée entre lame et lamelle et le résultat apprécié par microscopie en fluorescence. Ces auteurs estiment que les résultats sont très favorables : sur 40 sérums, 39 positifs forts et 1 faible.

A. *Essai de la technique de* Fife *et* Muschel

Ces essais ont été menés en collaboration avec le Docteur Mattern à l'Institut Pasteur de Dakar.

Matériel.

Nous avons utilisé le matériel suivant :

a) *Le conjugué :*

— Sérum de cheval antiglobuline humaine vendu conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine par la Sylvana Chemical Company (Orange, New Jersey, U.S.A.), lot n° 110.602;

— Sérum de cheval anti-sérum humain total de l'Institut Pasteur, également conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine par le Docteur Mattern.

b) *L'antigène.* — C'est une suspension de *Trypanosoma gambiense*, souche Lariviere, déjà décrite. Nous avons recueilli les trypanosomes par centrifugation dif-

férentielle à partir du sang, puis avons achevé d'éliminer les globules rouges par action d'un sérum agglutinant anti-éléments figurés de *Cricetomys gambianus*, obtenu par immunisation du coq ou du lapin. On lave plusieurs fois les trypanosomes dans une solution tamponnée à pH — 7,2.

PO_4HNa_2, $2H_2O$: 8,52 g
PO_4H_2K : 2,54 g
Eau distillée q.s.p. : 1 000 ml

Lors du premier de ces lavages, la solution tampon est en outre formolée à 1 p. 100. Enfin, on ajuste à la concentration de 10^7 trypanosomes/ml.

c) *Matériel optique.* — Les lectures sont faites à l'aide d'un microscope Reichert équipé d'une lampe Osram.

La réaction se fait en tubes à centrifuger en suivant exactement les indications de Fife et Muschel.

Résultats.

Nous n'avons pas eu de résultats satisfaisants; nous constatons une fluorescence non spécifique dans les témoins comme dans les sérums pathologiques.

B. *Essai de la technique de* Niel et Fribourg-Blanc

Devant cet échec, nous nous sommes inspirés du test d'immuno-fluorescence de la syphilis, tel qu'il est décrit par Niel et Fribourg-Blanc [125], épreuve sur lame qui a en outre l'avantage d'être beaucoup plus économique en réactifs.

Réactifs.

a) *L'antigène* est le même que précédemment mais dilué de façon à avoir environ 50 à 100 trypanosomes

par champ. Dans un deuxième temps nous avons effectué des essais avec une suspension de trypanosomes non formolée.

b) *Les sérums conjugués :* Nous avons utilisé :

— un sérum de lapin anti γ-globuline de titre élevé, conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine, qui nous a été aimablement donné par MM. Fribourg-Blanc et Niel,

— un sérum de cheval anti β_2-macroglobuline, lot lot 272 P de la Behring Werke, Marburg (Allemagne Fédérale),

— un sérum de chèvre anti β_{2A}, lot C 206.7ABS 8962, fourni par Hyland Laboratories, Los Angeles (U.S.A.).

Les deux sérums ont été conjugués par nos soins à l'isothiocyanate de fluorescéine en suivant la technique proposée par Niel et Fribourg-Blanc [125]. Les globulines sériques sont précipitées par « salting-out » (nous avons utilisé le sulfate d'ammonium à demi-saturation au lieu du sulfate de sodium employé par ces auteurs). On recueille le précipité par centrifugation: on le redissout dans la solution tampon suivante :

PO_4HNa_2, 2 H_2O : 2 g
PO_4H_2K : 0,45 g
ClNa : 8,5 g
Eau distillée q.s.p. 1 000 ml

dont le pH est 7.2. Puis on répète la précipitation. On reprend le précipité par la même solution tampon. Si l'on est parti de 5 ml de sérum on fait en sorte que le volume final soit de 2,5 ml. Cinq mg d'isothiocyanate de fluorescéine sont dissouts dans 0,5 ml de la solution suivante :

CO_3Na_2 : 1,66 g
CO_3HNa : 3,36 g
Eau distillée q.s.p. 100 ml

Cette quantité est ajoutée à la solution protéique; on ajuste enfin à 5 ml avec la solution tampon de pH = 7,2. On laisse reposer à + 4°C pendant 24 heures. On peut dialyser contre la même solution tampon pour éliminer l'excès d'isothiocyanate non fixé, mais d'après les auteurs ce n'est pas absolument nécessaire.

Matériel :

La réaction se pratique sur des lames porte-objet microscopique siliconées que nous avons préparées ainsi : on grave au diamant trois carrés de 1 cm de côté sur chaque lame; leurs surfaces sont protégées par du vernis à ongle, puis les lames sont siliconées par immersion dans une solution au 1/100 de Siliclad (Clay Adams, New York, U.S.A.) pendant 10 minutes. On enlève ensuite le vernis à l'aide d'acétone.

On a donc finalement des lames siliconées sauf au niveau des carrés. Ceci permet d'éviter un étalement des réactifs sur toute la lame et le mélange des gouttes.

Les lectures sont faites à l'aide d'un microscope Ortholux Leitz, muni d'une lampe à vapeur de mercure Philips CS 150. Les filtres utilisés sont :

— un filtre anticalorique,

— un filtre UG 1 de 2 ou 4 mm d'épaisseur.

Pratique de la réaction.

— Sur chaque carré est déposée une goutte de suspension de trypanosomes;

— On laisse sécher à l'étuve à 37°C ce qui fixe les trypanosomes sur la lame;

— On dépose 0,10 ml (2 gouttes à la pipette de Duclaux) de sérum à tester dilué dans la solution tampon de pH = 7,2 sur chaque étalement. Les lames sont alors laissées une heure à l'étuve à 37°C en chambre humide : c'est le temps de fixation du premier complexe antigène-anticorps.

Puis on rince avec la même solution tamponnée, on essore les lames, puis on distribue une goutte de conjugué dilué sur chaque carré et on replace 15 minutes à l'étuve à 37°C en atmosphère humide : c'est le temps de fixation du complexe γ-globuline/sérum anti-γ-globuline humaine; on rince à nouveau et on égoutte les lames Les préparations recouvertes de lamelles sont alors prêtes pour la lecture.

Résultats.

1° Nous n'avons eu aucune fluorescence nette tant que nous avons utilisé une suspension de trypanosomes formolés. Nous l'avons donc abandonné au profit de la suspension non formolée.

2° Avec cette nouvelle suspension nous avons cherché la dilution de conjugué ne donnant pas de fluorescence au niveau du témoin.

Avec le sérum anti-γ-globulines utilisé, la dilution de 1/40 est satisfaisante.

3° Dans ces conditions, nous avons étudié :

— 5 sérums normaux,

— 15 sérums de trypanosomés,

— 2 sérums riches en β_2-macroglobuline, mais non trypanosomés.

Ces sérums ont été dilués au : 1/20, 1/40 et 1/80.

La fluorescence a été évaluée selon l'échelle proposée par Goldman [62].

± pas de fluorescence nette, organisme vaguement visible,

\+ fluorescence nette, mais de couleur mal définie,

\+\+ fluorescence nette, couleur jaune-verte, mais de faible intensité,

\+\+\+ Couleur intense,

\+\+\+\+ Couleur brillante.

Les sérums témoins ou pathologiques non trypanosomés, ne montrent pratiquement pas de fluorescence (jamais plus du douteux (±) et seulement à leur première dilution). Les sérums de trypanosomés sont tous nettement fluorescents au 1/40 et certains au 1/80. Cependant, la fluorescence ne dépasse pas ++.

Ajoutons enfin, que les essais avec des sérums anti-β_2M- ou β_2A-globulines ont été négatifs.

Discussion.

Il est encore trop tôt pour juger de la valeur de cette méthode; cependant, les premiers résultats que nous rapportons paraissent encourageants.

Bien que les fluorescences que nous avons obtenues soient assez peu intenses, la différence entre témoin et sérum de trypanosomé est indiscutable.

Un autre point à noter est la nécessité d'abandonner la formolisation des trypanosomes proposée par Fife et Muschel [49] pour *T. cruzi*.

Les conjugués révélant d'autres globulines que la γ, n'ont pas donné de résultats : ces données sont trop fragmentaires pour pouvoir être interprétées.

Nous n'avons pu continuer ces essais sur un plus grand nombre de sérums de trypanosomés, parce que l'antisérum conjugué de haut titre qui s'était montré efficace, était épuisé. Nous comptons reprendre ces expériences sur des séries plus importantes.

CHAPITRE 5

PRÉPARATION ET ÉTUDE DU POUVOIR ANTICORPS DE FRACTIONS SÉRIQUES

Dans ce chapitre, nous décrirons en premier lieu les méthodes de fractionnement et de contrôle que nous avons utilisées en vue de préparer des γ-globulines et des β_2-macroglobulines aussi pures que possible. L'état actuel des techniques d'isolement de la β_{2A}-globuline, nous a paru insuffisant pour nous permettre cette étude avec les quantités de sérums dont nous disposions. Les étapes de ces fractionnements nous ont conduit à préparer deux sous-fractions des γ-globulines selon leur nature eu- ou pseudo-globulinique. Nous décrirons ensuite les résultats des essais d'inhibition de la respiration des trypanosomes avec ces fractions.

I. Préparation des fractions

Les sérums de trypanosomés conservés au froid laissent souvent précipiter une cryoglobuline. Aussi avons-nous veillé à ce qu'au cours de la coagulation du sang et de la rétraction du caillot, les échantillons ne soient à aucun moment entreposés à basse température, de façon

à ne pas éliminer cette cryoglobuline, dont nous avons pu vérifier la nature β_2-macroglobulinique.

Le tableau III résume l'ensemble des opérations chimiques que nous avons effectuées. Nous nous bornerons à le commenter.

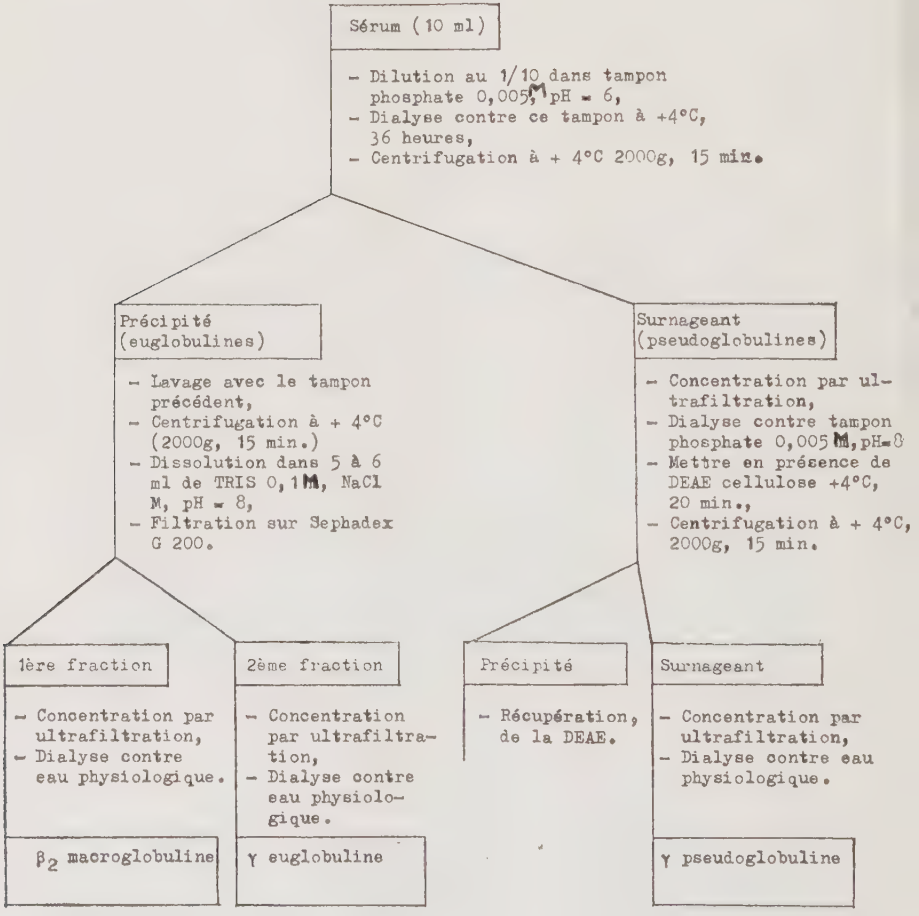


TABLEAU III

A. *Fractions euglobuliniques* (γ- *et* β_{2M}-*globulines*)

Les euglobulines sont obtenues par précipitation des protéines en milieu de faible force ionique et de pH proche du point isoélectrique. Nous avons dilué 10 ml de sérum au 1/10 et l'avons laissé dialyser sous agitation magnétique à + 4°C, contre trois litres de la solution tampon suivante :

PO_4HNa_2, $2H_2O$: 0,022 g
PO_4H_2Na, H_2O : 0,672 g
Eau distillée q.s.p. 1 000 ml,
dont le pH = 6,0.

Cette solution est renouvelée trois fois en 36 heures. Le contenu du boyau de cellophane est alors centrifugé. Le précipité euglobulinique est remis en suspension dans la même solution tampon et centrifugé à nouveau.

Les euglobulines sont dissoutes dans 5 ml de la solution suivante :

Tri-hydroxy-méthyl-amino-méthane (TRIS) : 7,96 g.
NaCl : 58,45 g.
HCl 0,033 N q.s.p. : 1 000 ml,
dont le pH est de 8,0.

Ces 5 ml sont ensuite soumis à la filtration sur gel de dextrane (Sephadex G 200 provenant de la maison Pharmacia Upsal, Suède) selon les indications de Hoc-man et Killander [81].

Cette récente technique permet la séparation des molécules en fonction de leur taille particulaire, les molécules les plus grosses passant les premières. Nous avons préféré appliquer cette méthode à la séparation du précipité euglobulinique plutôt qu'au sérum total, comme l'ont fait ces auteurs. Nous pouvions ainsi espérer avoir

d'emblée des préparations de β_2-macroglobuline et de γ-euglobulines pratiquement pures.

Filtration sur Sephadex G 200.

Nous avons utilisé deux types de colonnes :

— diamètre 2,9 cm, hauteur 50 cm,
— diamètre 2,7 cm, hauteur 80 cm.

La colonne a été préparée selon les indications de Flodin [55] à l'aide de Sephadex G 200, équilibré avec la même solution tampon TRIS de pH = 8. Les 5 ml de solution protéique sont déposés au sommet de la colonne et la filtration se poursuit à la température du laboratoire (+ 20°C) pendant environ 15 à 18 h. Les effluents sont recueillis par fractions de 2 ml à l'aide d'un collecteur. Le contrôle de la teneur protéique de l'effluent se fait grâce à l'enregistreur UVICORD (L.K.B. Aktiebolaget, Stockholm, Suède) qui fournit une courbe de la transmission à 254 mμ. La figure 4 donne un exemple typique de la séparation en deux fractions

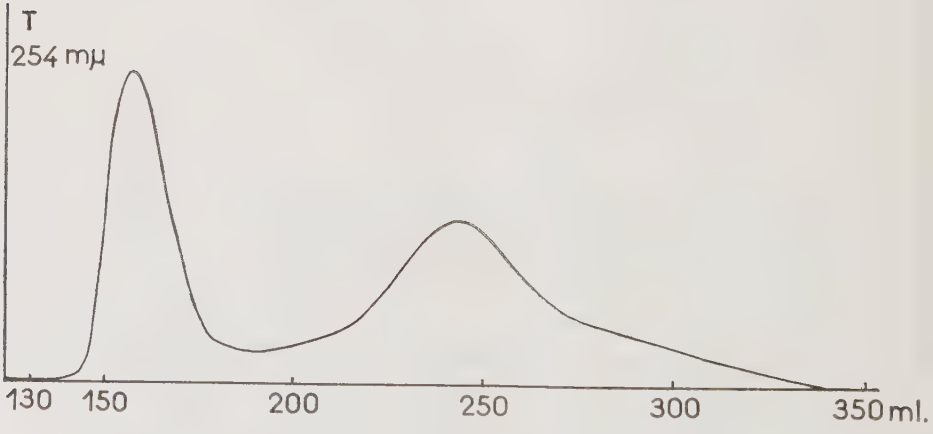


FIG. 4

Filtration sur Sephadex G 200.
Courbe de Transmission à 254 m μ enregistrée avec l'appareil Uvicord (L.K.B.).

obtenues. Nous avons rassemblé le contenu des tubes correspondant à une même fraction en éliminant largement les tubes intermédiaires de façon à éviter la contamination des fractions l'une par l'autre.

Après avoir pratiqué un dosage de protéines par la méthode du biuret selon WEICHSELBAUM [187] sur chacun des deux échantillons, ceux-ci sont concentrés environ vingt fois par ultrafiltration sous vide à + 4°C à l'aide de boyau de cellulose Visking 8/32 selon la technique de SMITH [158].

Ces préparations sont enfin dialysées contre du sérum physiologique pour éliminer l'excès du TRIS et de chlorure de sodium. Nous pratiquons alors un nouveau dosage de protéines et la quantité convenable pour la pratique du test d'inhibition de la respiration des trypanosomes est prélevée.

Dans quelques cas, nous avons préparé simplement la cryoglobuline souvent présente dans le sérum des sommeilleux, par maintien du sérum à + 4°C, et centrifugation à la même température. La protéine est purifiée par redissolution dans l'eau physiologique tiède et reprécipitation à froid.

B. *Fractions pseudoglobuliniques.*

Elles sont contenues dans le surnageant après élimination par centrifugation du précipité d'euglobulines. Nous avons tout d'abord ramené cette solution au volume initial de sérum par ultrafiltration. Puis nous l'avons dialysée contre une solution tampon de pH = 8, dont la composition est la suivante :

PO_4HNa_2, $2H_2O$: 0,719 g
PO_4H_2Na, H_2O : 0,076 g
Eau distillée q.s.p. : 1 000 ml

Dans les tubes à centrifuger de 50 ml, contenant de

la DEAE-cellulose préalablement équilibrée avec le même tampon, on introduit la solution de pseudo-globulines dans la proportion de 1 ml pour 1 g de DEAE-cellulose (DEAE-cellulose titrant 0,70 mE/g à 20°C). Les tubes sont maintenus à + 4°C. On met la DEAE-cellulose en suspension et on la laisse 20 minutes en contact avec la solution protéique. Dans ces conditions la DEAE-cellulose fixe toutes les protéines sauf les plus basiques d'entre elles, qui sont des γ-globulines.

La DEAE-cellulose est alors éliminée par centrifugation à + 4°C. Le surnageant est concentré par ultrafiltration et dialysé contre du sérum physiologique.

II. Contrôle de la pureté des fractions

Méthodes.

Deux méthodes ont été employées : essentiellement l'analyse immuno-électrophorétique en employant divers antisérums, et plus accessoirement l'électrophorèse en gel de gélose.

Electrophorèse en gel de gélose.

Nous avons utilisé une micro-méthode permettant d'opérer sur des lames porte-objet de microscope. La technique utilisée est celle de Wieme [191] avec quelques modifications décrites par Masseyeff et coll. [115] La coloration des protéines se fait selon Uriel et Grabar [181].

Analyse immuno-électrophorétique.

Nous avons employé la micro-méthode de Scheidegger [154] avec des modifications mineures.

Nous avons utilisé les antisérums suivants pour ces contrôles :

— sérum de cheval anti-sérum humain normal de l'Institut Pasteur (lot 491, 224 et 365, ces deux derniers en mélange),

— sérum de lapin anti-β_2-macroglobuline, obtenu par immunisation de l'animal par voie intramusculaire par des macroglobulines de sujets trypanosomés, additionnées d'adjuvant de Freund,

— sérum de cheval anti-β_2-macroglobuline, lot 272P (Behring Werke, Marburg, Allemagne Fédérale),

— sérum de chèvre anti-β_{2A}-globuline, lot C 206-7ABS-8962 (Hyland Laboratories, Los Angeles, U.S.A.).

Résultats

Les figures 5 et 6 donnent un exemple typique du résultat de ces contrôles.

— *Pseudo-globulines :* Elles contiennent une grande variété de fractions et en particulier de la β_{2A}- et de la γ-globuline. En revanche, la β_2-macroglobuline très abondante dans le sérum des trypanosomés y paraît ou absente ou présente à l'état de traces.

— *γ-pseudo-globulines :* Généralement, la fraction ne paraît contenir que de la γ-globuline. Toutefois, quelques préparations ont été moins satisfaisantes : nous avons observé la présence d'impuretés constituées de sidérophiline, d'albumine et de quelques α_2-globulines. Parfois même nous avons reconnu la présence de β_{2A}-globuline; on ne retrouve en revanche pas de traces de β_2-macroglobulines.

— *γ-euglobulines :* Généralement la préparation paraît pure. Parfois nous avons observé la présence de sidérophiline et rarement une faible trace correspondant à la β_2-macroglobuline.

— *β_2-macroglobuline :* Les contrôles n'ont jamais montré d'impuretés.

Discussion

Notre objet étant l'étude du pouvoir anticorps des diverses immunoglobulines et particulièrement de la macroglobuline, il n'était pas rigoureusement nécessaire d'obtenir des fractions parfaitement pures. L'essentiel était de séparer les effets des trois principales globulines du système gamma : β_{2A}-, β_{2M}- et γ-globuline.

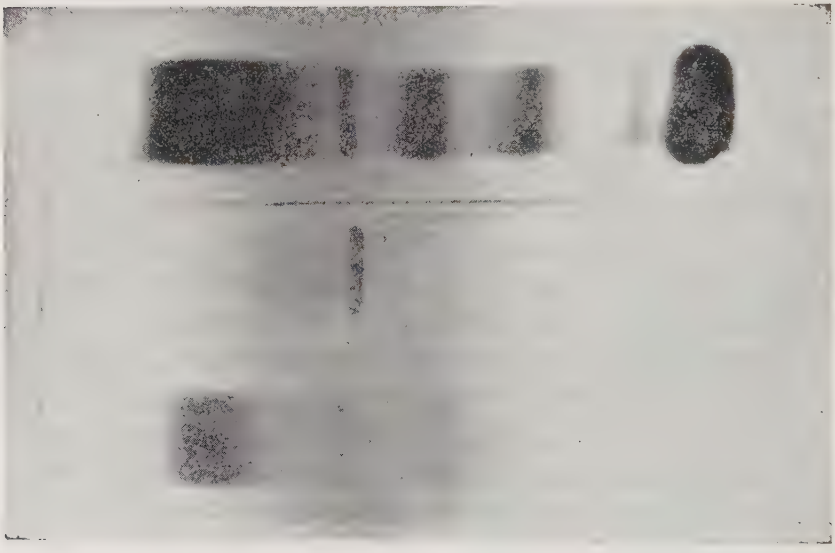


FIG. 5
Electrophorèse en gélose à pH 8,6, $\mu = 0{,}033$
De haut en bas : Sérum entier
Fraction β_2-Macroglobulinique.
Fraction γ-Eu-globulinique.

Nous avons du renoncer provisoirement à isoler la première, aucune des méthodes essayées ne nous ayant donné régulièrement satisfaction.

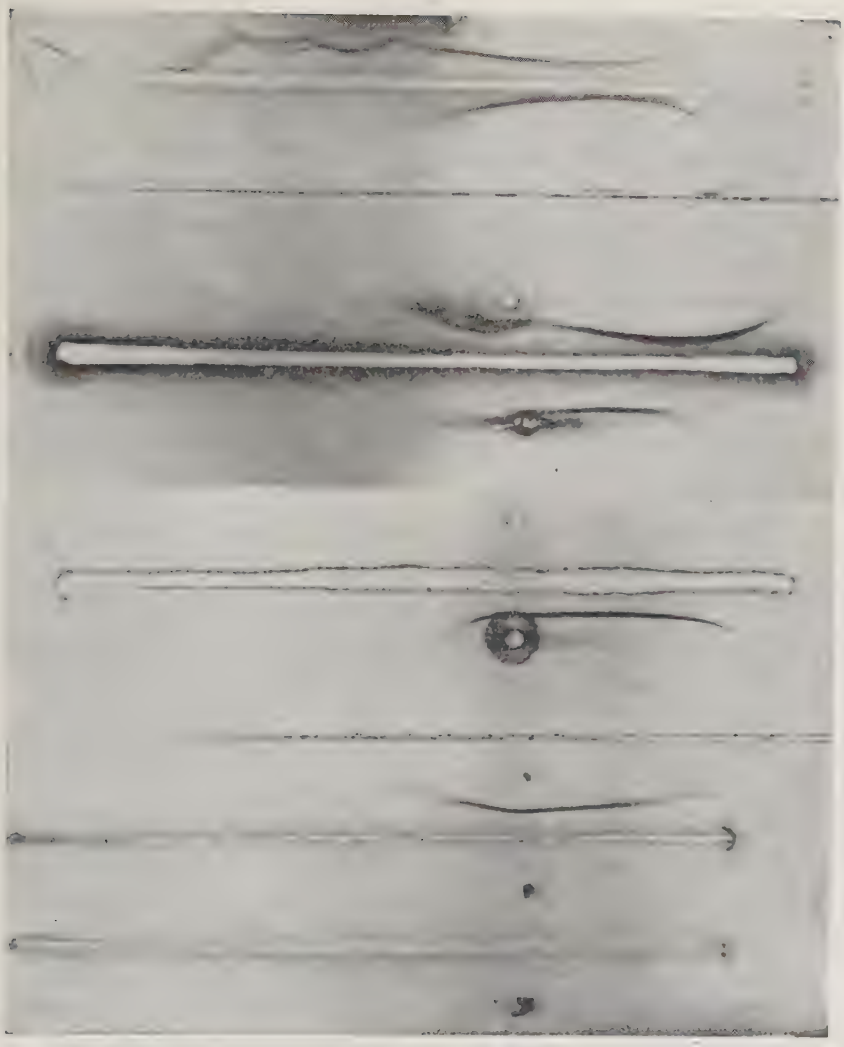


FIG. 6

Exemples d'analyse immuno-électrophorétique des diverses fractions.

L'extrémité anodique des lames est à gauche.
De haut en bas nous avons :

— des fractions Pseudoglobuliniques et γ — Pseudoglobuliniques;
— des fractions γ — Eu et β_2 — Macro-globuliniques révélées par du sérum anti-sérum humain normal de l'Institut Pasteur;
— des fractions γ — Eu et β_{2M}-globulines révélées par du sérum de cheval anti β_2 — Macro-globuline (Behringwerke);
— des fractions Pseudoglobuliniques, β_{2M} — et γ-Eu-globulinique révélées par du sérum de chèvre anti β_2 A — globulines (Hyland Laboratories).

En revanche, la préparation de la β_2-macroglobuline peut être considérée comme très satisfaisante. Comme les pseudo-globulines ne paraissent dans ce cas plus guère contenir de β_2-macroglobulines, nous avons saisi la possibilité de dosage que cette méthode de préparation nous offrait. Le tableau IV résume les résultats obtenus. Nous avons effectué une correction correspondant aux tubes éliminés lors de la collecte des fractions. Les valeurs indiquées correspondent à un minimum, car elles ne tiennent pas compte des pertes qui ont pu se produire lors de la précipitation des eu-globulines. Celles-ci paraissent d'ailleurs faibles.

Des évaluations du taux de la β_2-macroglobulinémie ont été faites par d'autres chercheurs. MATTERN et coll. [117] et BENTZ [10] ont utilisés une méthode immunologique. Les premiers trouvent que sur 152 malades, 149 présentent dans leur sérum un taux de β_2-macroglobuline environ 16 fois supérieur à la normale. Pour BENTZ, ce taux est en moyenne environ 9 fois le taux normal. Ces chiffres sont notablement supérieurs à ceux que nous avons trouvés et nous n'avons pas d'explication pour cette discordance. MATTERN et coll. [117] signalent que chez 19 malades ayant un taux immunologique de β_2-macroglobuline environ 16 fois supérieur à la normale, 7 sérums ne montrent pas à l'ultracentrifugation d'augmentation significative des macroglobulines. Ce fait est réellement surprenant et encore sans explication. Il avait du reste été déjà signalé par DREYFUS et coll. [39] qui remarquent qu'un trypanosomé présentait en phase d'état de la maladie, une hyper-β_2-macroglobulinémie identifiable tant par l'immuno-électrophorèse que par l'ultracentrifugation, tandis qu'après traitement, le diagramme sédimentaire était devenu normal, alors qu'il subsistait une hyper-β_2-macroglobulinémie à l'analyse immuno-électrophorétique.

TABLEAU IV

Dosage de la β_2-macroglobuline dans les sérums de trypanosomés après son isolement.

Sérums	Quantité en mg/ml	Taux par rapport à la normale (1,0)
DK D/489	2,1	2,8
BD 50/62	3,0	4,0
BD 53/62	3,0	4,0
DK 10	3,4	4,5
BD KF/1	3,4	4,5
DK 24	3,4	4,5
BD 1/63	3,8	5,0
DK 40	7,1	9,4
DK 30	7,6	10,1
BD 40/62	8,1 (*)	10,8
BD 39/62	10,6	13,4
Moyenne des sérums de trypanosomés	5,05	6,7
Sérum normal africain	1,5	2,0
Sérum normal selon Heremans [78]	0,75	1,0

(*) Le taux de 8,1 mg/ml rapporté pour le sérum BD 40/62, comporte 4,0 mg/ml de cryoglobuline.

Mattern et coll. [117] suggèrent que ces globulines ayant la spécificité immunologique de β_2-macroglobuline pourraient être comparables au « monomère » identifié par Sandor dans ce qu'il nomme l'euglobuline I des sérums de chevaux immunisés par voie intraveineuse à l'aide d'antigènes bactériens [151]. Ce monomère de constante de sédimentation 5,5 S à la même spécificité immunologique que le polymère, c'est-à-dire la macroglobuline proprement dite. Ces faits demandent encore à être étudiés. Néanmoins, les contrôles immunologiques que nous avons pratiqués lors de nos fractionnements, ne montrent apparemment pas la présence abondante dans d'autres fractions d'un constituant possédant cette même spécificité antigénique. Cette question tournant autour de l'éventuelle identification d'un nouveau constituant du sérum, est évidemment de grande importance et nous nous proposons de reprendre ultérieurement ces essais avec des contrôles quantitatifs aussi rigoureux que possible au cours de chacune des étapes du fractionnement.

Les contrôles immuno-électrophorétiques de nos fractionnements ont montré que seule la séparation de la β_2-macroglobuline était tout à fait satisfaisante.

Les autres fractions contiennent souvent quelques impuretés mais à quelques exceptions près, celles-ci ne sont pas faites de globulines à pouvoir anticorps.

L'interprétation des résultats du test d'inhibition de la respiration des trypanosomes pratiqué avec ces fractions, ne s'en trouve donc, en principe, pas gênée.

Il semble en particulier, que la chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose aurait donné des résultats supérieurs pour l'isolement de la γ-pseudo-globuline. Mais celle-ci exige un contrôle rigoureux de la température de la colonne et nous ne disposions pas encore du matériel nécessaire. Ces expériences seront reprises

avec de meilleures conditions techniques désormais possibles.

III. Etude de l'inhibition de la respiration des trypanosomes par les fractions sériques

A. *Méthodes et résultats*

Nous avons effectué le fractionnement de 14 sérums, tous de hauts pouvoirs inhibiteurs. L'épreuve d'inhibition de la respiration des trypanosomes a été conduite comme décrit plus haut en substituant au sérum à tester une solution de la fraction protéique contenant 7 mg de protéines dans 1 ml, pour la β_2-macroglobuline, les γ-eu- et pseudo-globulines. Les pseudo-globulines totales ont été ramenées au volume initial du sérum et un ml a été prélevé pour le test.

La quantité de 7 mg est légèrement supérieure au taux moyen de macroglobuline par ml de sérum, tel que nous l'avons déterminé (rappelons ici que nos valeurs sont données par défaut). Cette quantité a été adoptée aussi pour les γ-globulines, bien que leur taux soit beaucoup plus fort que celui de la β_2-macroglobuline. Deux raisons nous y ont conduit: en premier lieu, du fait de la séparation en eu- et pseudo-globulines, c'est en fait 14 mg qui ont été soumis au test. D'autre part, nous avons déjà souligné que les indices d'inhibition sont relativement insensibles à la dilution tant que celle-ci demeure faible. Les figures 7, 8 et 9 montrent les principaux types de courbes obtenues.

Le tableau V indique les chiffres obtenus.

Un certain nombre de déterminations n'ont pu être pratiquées soit par suite de perte accidentelle de la frac-

TABLEAU V

Indices d'inhibition de la respiration des trypanosomes obtenus avec diverses fractions sériques.

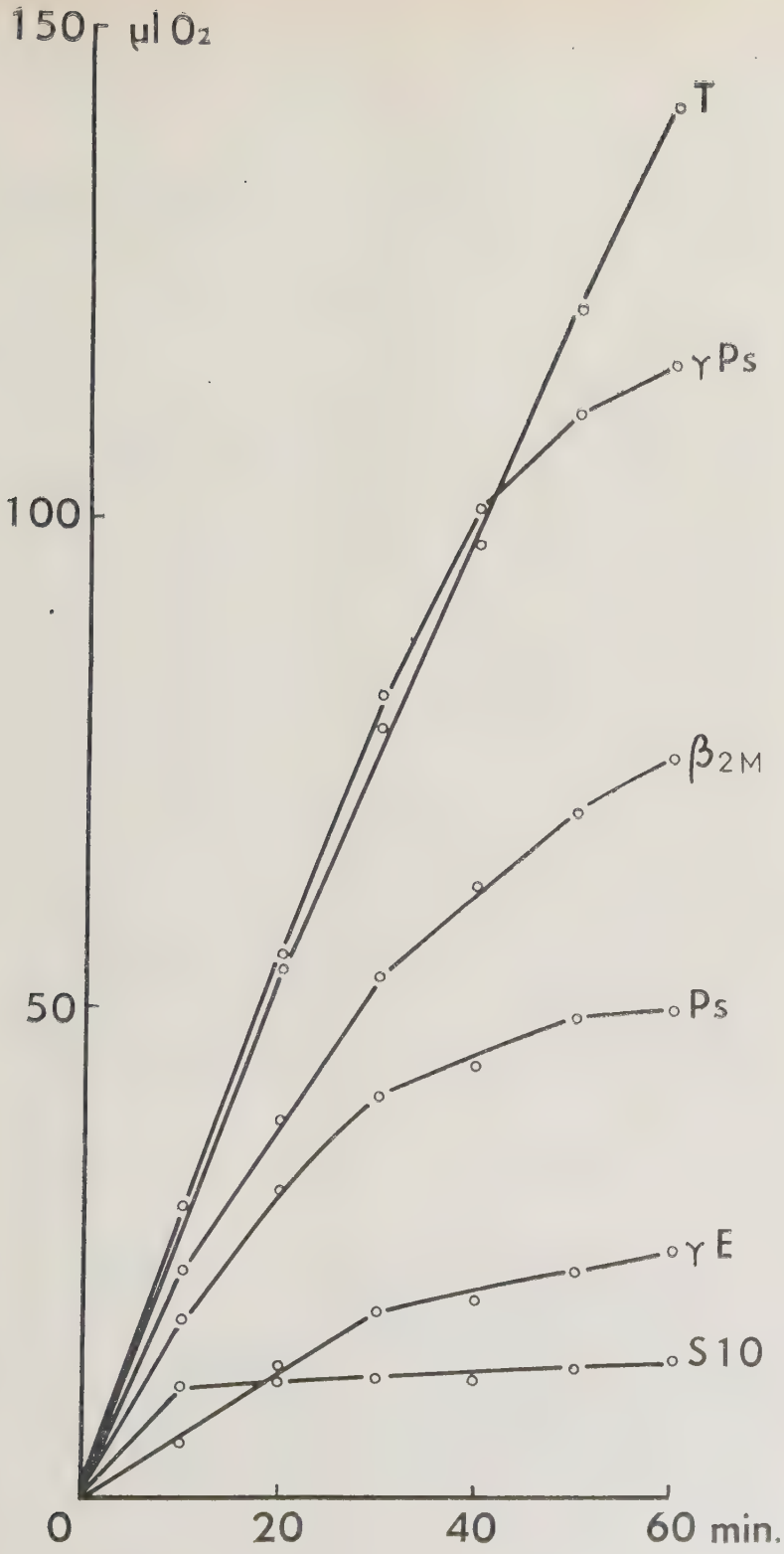
Sérums	Ps	γ-Ps	γ-Eu	β_2M	Type de localisation du pouvoir anticorps
Sindiougou 11		84		91	β_2-macroglobuline et pseudoglobuline (en particulier γ-pseudo-globuline).
BD 1/63	80	80	29	70	
DK/D/489	69	71	36	73	
DK 24	83		54	55	Pseudoglobulines.
DK 31	83		51	39	
BD 40/62	72		46	51	
BD 50/62	82	35	60	60	
DK 40	78		29	51	
DK 10	65	17	82	46	γ-euglobulines et pseudoglobulines.
BD/KF 1	83	67	73	65	
BD 39/62	87	65	83	55	
DK/D/523		89	75	83	Toutes fractions.
DK 30	93	93	92	92	
BD 53/62	82	82	90	67	
Sérum normal	0	0	0	0	

→

FIG. 7

Courbes d'inhibition de la respiration des Trypanosomes en présence de :

T = Sérum normal.
S 10 = Sérum trypanosomé n° DK 10.
P S = Fraction Pseudoglobulinique.
γ E = Fraction γ — Eu-globulinique.
β_2 M = Fraction β_2 — Macroglobulinique du même sérum.
γ Ps = Fraction γ-Pseudoglobulinique.


150
µl O2
100
50
0
20
40
60 min.
T
γ Ps
β2M
Ps
γ E
S10

tion correspondante, soit parce que la pureté de cette fraction nous a paru insuffisante.

B. *Discussion*

1° *Etude des causes d'erreurs.*

Nous avons déjà attiré l'attention sur le rôle des facteurs nutritifs contenus dans le sérum et souligné que la quantité de 0,3 ml de sérum paraissait insuffisante à couvrir les besoins d'une suspension très riche en trypanosomes (c'est-à-dire, en pratique, consommant plus de 150 µl O_2/heure). Lorsque l'épreuve est pratiquée sur du sérum, cette condition est évidemment plus que remplie. En revanche, tel n'est pas le cas pour les fractions. Un apport excessif de sérum normal fausse les résultats (cf. p. 100). Quelques essais à l'aide d'ultrafiltrat de sérum humain normal et de liquide amniotique humain, nous ont conduit à des résultats encourageants.

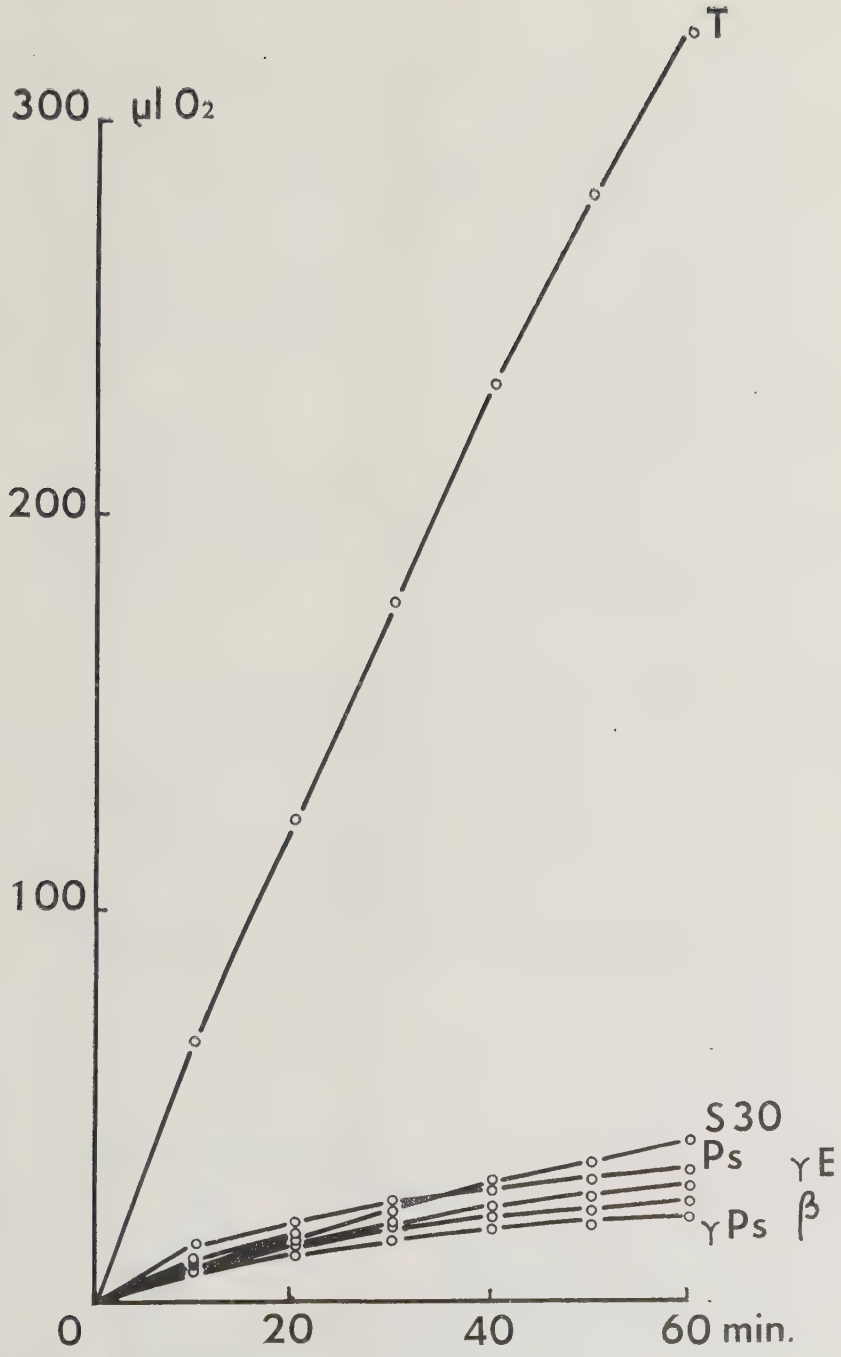
Nos plus récentes expériences nous amènent à penser que l'addition d'ultrafiltrat de sérum à la dose de 1 ml, permettra de satisfaire les exigences nutritionnelles des trypanosomes sans introduire de phénomènes parasites. L'apport de complément peut être obtenu à l'aide de 0,3 ml de sérum humain frais, quantité insuffisante pour qu'apparaissent les interférences déjà signalées.

→

FIG. 8

Courbes d'inhibition de la respiration des Trypanosomes en présence de :

T = Sérum normal.
S. 30 = Sérum de Trypanosomé n° D K 30.
Ps = Fraction pseudoglobulinique.
γ Ps = Fraction γ-pseudoglobulinique.
γ Eu = Fraction γ-Eu-globulinique.
β_2 M = Fraction β_2-Macroglobulinique du même sérum.


T
300 µl O2
200
100
S 30
Ps
γ E
γ Ps
β
0
20
40
60 min.

Des faits rapportés plus haut, on peut conclure qu'il faut être prudent dans l'interprétation des expériences où la consommation d'oxygène de la fiole considérée a dépassé 110 à 120 μl O_2/heure. On peut se demander si elle n'aurait pas été plus forte avec une quantité plus satisfaisante de facteurs nutritionnels. Cette objection tombe lorsque l'inhibition est franche. C'est pourquoi nous avons fait apparaître en caractères gras les valeurs qui nous paraissent incontestables, les autres étant données à titre indicatif.

Nous avons vérifié que les mêmes fractions obtenues à partir d'un sérum humain normal ne présentaient pas de pouvoir inhibiteur. Ceci exclut en particulier la survenue de phénomènes parasites dus aux manipulations de la préparation.

2° *Interprétation des résultats.*

Le tableau V fait ressortir plusieurs faits :

— Quelques sérums ont manifesté un pouvoir inhibiteur sur toutes les fractions;

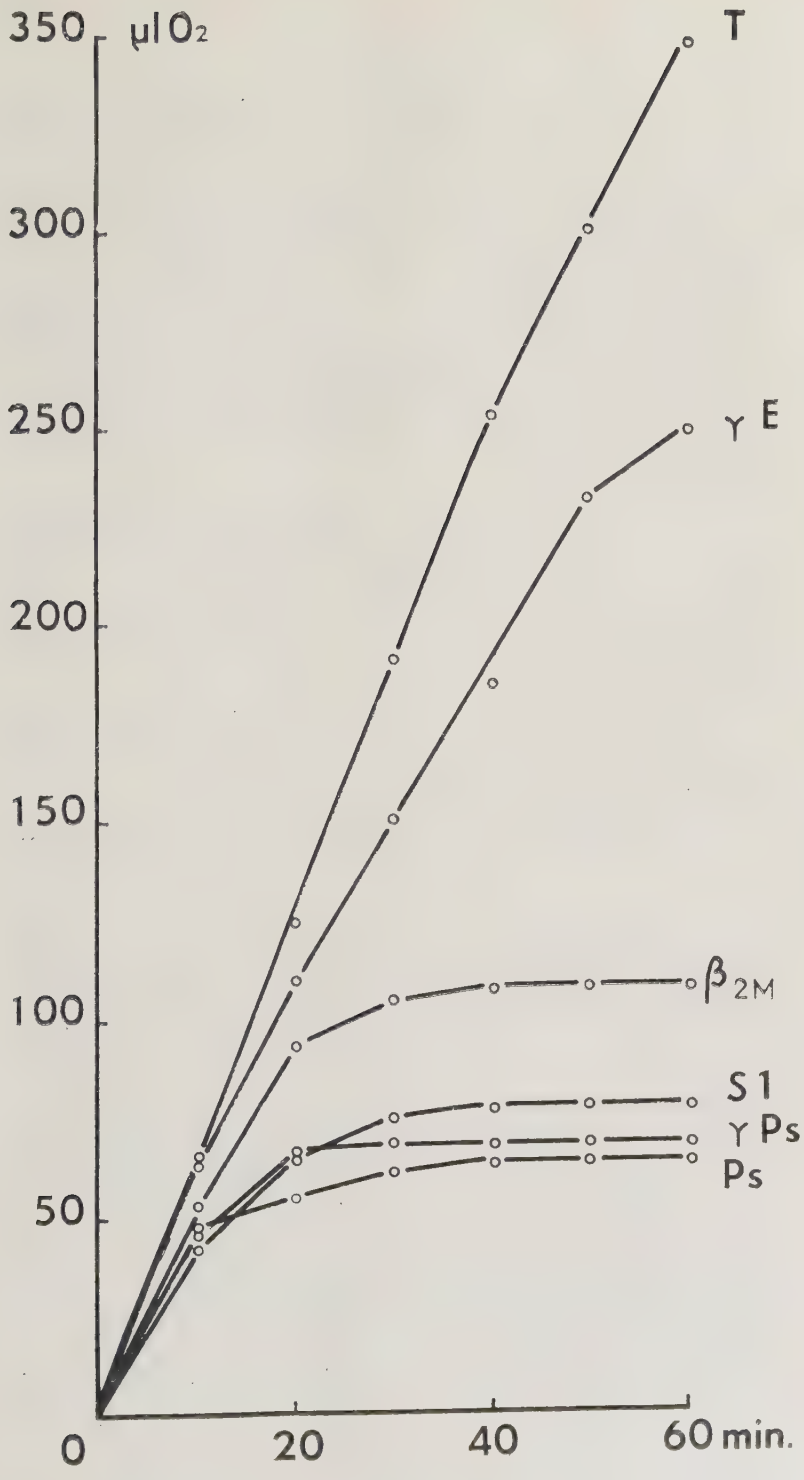
— Pour les autres sérums le pouvoir anticorps est localisé soit au niveau des pseudo-globulines seules, soit à la fois dans les pseudo-globulines et la γ-eu-globuline, soit enfin, dans les γ-pseudo-globulines associées à la β_2-macroglobuline. Ceci permet de classer les sérums en quatre groupes.

→

FIG. 9

Courbes d'inhibition de la respiration des Trypanosomes en présence de :

T = Sérum normal.
S 1 = Sérum de Trypanosomé n° BD 1/63.
P S = Fraction pseudoglobulinique.
γ P S = Fraction γ-pseudoglobulinique.
γ E = Fraction γ-Eu-globulinique.
β_2 M = Fraction β_2-Macroglobulinique du même sérum.


350
µlO2
300
250
200
150
100
50
0
20
40
60 min.
T
γ E
β2M
S1
γ Ps
Ps

— Nous avons indiqué dans l'introduction les raisons qui nous ont fait entreprendre ce travail : la mise en évidence constante par MATTERN et coll. [118] d'une exceptionnelle hyper-β_2-macroglobulinémie chez les trypanosomés. Quelques essais effectués par les mêmes auteurs, montraient qu'on pouvait obtenir une fixation du complément à l'aide de macroglobulines isolées grâce à leur propriétés cryoglobuliniques. Une hypothèse de travail était que les macroglobulines jouent un rôle particulier dans les processus de défense contre l'agression des trypanosomes.

Les présents résultats semblent infirmer en partie cette hypothèse puisque la macroglobuline ne paraît jamais posséder à elle seule l'essentiel du pouvoir inhibiteur. Dans environ la moitié des cas, ce pouvoir est même faible.

— Certains résultats (sérums DK 10 et BD 50/62) soulèvent le problème du rôle éventuel de la β_2A-globuline dans le pouvoir anticorps.

Ces conclusions ne peuvent être encore que provisoires.

En admettant que les techniques utilisées ici aient donné toutes leurs possibilités, il faut souligner certaines difficultés théoriques d'interprétation. La fraction γ-pseudo-globuline en particulier, ne présente jamais toutes les γ-globulines *sensu stricto*. Une partie reste, dans les conditions opératoires, fixée sur la DEAE-cellulose. L'utilisation de colonnes chromatographiques n'améliore qu'en partie ce défaut puisqu'une certaine proportion des γ-globulines demeure pratiquement indissociable de la β_2A-globuline. De toute façon, les γ-globulines isolées ne constituent certainement pas un échantillon représentatif de l'ensemble des γ-globulines.

Il n'est pas certain que les manipulations auxquelles

sont soumises les immunoglobulines, n'altèrent pas, au moins partiellement, leur pouvoir anticorps. Les divers types d'immunoglobulines n'ont pas nécessairement la même sensibilité à cet égard.

Une des difficultés les plus sérieuses vient de notre manque de connaissances sur la nature des antigènes des différentes souches de trypanosomes et de leur variation lorsque le parasite est entretenu sur animal de laboratoire Une hypothèse admissible est qu'il existe des motifs antigéniques particuliers, capables de déclencher spécifiquement la production d'un type spécial d'immunoglobuline, par exemple la β_2-macroglobuline. Il n'est pas certain que la souche de laboratoire conserve ce motif intact et cela pourrait conduire à des conclusions erronées.

Enfin, comme nous l'avons souligné dans la première partie, de nombreux auteurs ont observé des modifications de la localisation du pouvoir anticorps au cours d'une immunisation. Il est possible qu'il en soit ainsi au cours de la trypanosomiase et il serait intéressant de pouvoir suivre cette évolution au moins chez l'animal de laboratoire. Quelles que soient ces limitations théoriques, les résultats positifs que nous avons enregistrés, sont encourageants et doivent nous conduire à reprendre ces expériences avec des techniques plus élaborées.

Les essais à l'appareil de Warburg seront conduits en utilisant des modalités techniques améliorées. comme de récents essais nous en ont montré la possibilité. Il serait également souhaitable de pratiquer cette épreuve à l'aide de souches différentes de trypanosomes.

Le fractionnement des γ-globulines sera réalisé sur colonne de DEAE-cellulose ou de DEAE-Sephadex : ceci conduira sans nul doute à des résultats plus réguliers.

Enfin, il n'est pas possible d'étudier une activité anti-

corps sans recourir à une grande variété d'épreuves sérologiques. Jusqu'ici, la méthode d'immuno-fluorescence n'a conduit à des résultats positifs qu'avec des sérums anti-γ-globuline. Il est encore prématuré d'affirmer que le test sera toujours négatif avec les sérums anti-β_2A- et anti-β_2M-globuline.

Nous espérons dans l'avenir utiliser parallèlement les épreuves de fixation du complément, de conglutination et d'hémagglutination passive à l'aide d'antigènes améliorés.

Toutefois, répétons ici avec Desowitz [31] que le test respirométrique à l'appareil de Warburg nous paraît avoir un intérêt particulier en ce qu'il saisit l'effet des anticorps sur le parasite vivant et pris dans sa totalité.

CONCLUSION

Notre travail comporte deux parties : une première constitue un rappel de nos connaissances sur :

— les méthodes sérologiques utilisées au cours de la trypanosomiase africaine à *T. gambiense*,

— les divers types de globulines à pouvoir immunitaire,

— les méthodes d'isolement de ces espèces moléculaires.

La seconde partie rassemble nos résultats expérimentaux qui portent sur :

— Deux méthodes sérologiques :

  — l'épreuve d'inhibition de la respiration des trypanosomes par le sérum des malades,

  — le test d'immuno-fluorescence,

— Le fractionnement des immuno-globulines de quatorze sérums de trypanosomés,

— L'effet de ces fractions sur le test respirométrique.

I

La respiration d'une suspension de trypanosomes maintenue dans un milieu nutritif est inhibée en présence de sérums de malade. Nous avons montré que cette méthode appliquée par Desowitz aux trypanosomiases animales, est utilisable avec les sérums humains. Nous avons défini un protocole qui nous a permis d'étudier 80 sérums de trypanosomés, 28 sérums pathologiques de sujets indemnes de cette affection et 50 sérums normaux.

Les résultats pratiques sont satisfaisants :

Nous avons enregistré quelques cas de fausses réactions négatives mais aucune fausse réaction positive.

Cette méthode paraît satisfaisante sur le plan théorique car elle permet de suivre l'effet des anticorps sur le trypanosome vivant et pris dans sa totalité.

Avec la méthode utilisant les anticorps fluorescents nous avons obtenu des résultats encourageants bien qu'insuffisants en nombre.

II

Nous avons isolé et séparé :

la γ-eu-globuline,
la γ-pseudo-globuline,
la β_2-macro-globuline,

à partir de 14 sérums de trypanosomés.

Nous avons recherché l'influence de ces fractions sur la respiration des trypanosomes *in vitro*.

Nous avons mis trois résultats en évidence :

— il n'y a pas d'uniformité dans le mode de réaction immunitaire,

— la localisation du pouvoir anticorps varie d'un sujet à l'autre,

— la β_2-macro-globuline ne paraît pas avoir le rôle prépondérant que l'on aurait pu attendre.

Vu :

Le Président de la thèse,

P. VALDIGUIÉ.

Vu : *Le Doyen,*

Pour le Doyen, l'assesseur :

BLANC.

Vu et permis d'imprimer :

Toulouse, le 5 juin 1962

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,

P. DOTTIN.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Abelson (N.M.) et Rawson (A.J.). — Studies of blood group antibodies. I. Fractionation of anti A and anti B isohemagglutinins by anion-cation cellulose exchange chromatography. *J. Immunol.* (1959), *82*, 435-443.

[2] Abelson (N.M.) et Rawson (A.J.). — Studies of blood group antibodies. II. Fractionation of Rh antibodies by anion-cation cellulose exchange chromatography. *J. Immunol.* (1959), *83*, 49-56.

[3] Adinolfi (M.), Polley (M.J.), Hunter (D.A.) et Mollison (P.L.). — Classification of blood-group antibodies as β_2M or γ globulin. *Immunology* (1962), *5*, 566-579.

[4] Alesandro (P.A. d'). — Electrophoretic and ultracentrifugal studies of antibodies to Trypanosoma lewisi. *J. Infect. Dis.* (1959), *105*, 76-95.

[5] Askonas (B.A.), Farthing (P.) et Humphrey (J.H.). The significance of multiple antibody components in serum of immunized rabbits. *Immunology* (1960), *3*, 336-357.

[6] Auerswald (W.), Doleschel (W.), Rosak (M.) et Steffen (C.). — Physico chemical characterization of proteins obtained by elution from blood cells incubated with autoantibody containing sera. *Vox Sang* (1961), *6*, 478-488.

[7] Augustin (R.) et Hayward (B.J.). — Humans reagins to grass pollens and moulds : their purification and physico-chemical characterization. *Immunology* (1960), *3*, 45-73.

[8] Bauer (D.C.) et Stavitsky (A.B.). — On the different molecular forms of antibody synthesized by rabbits during the early response to a single injection of protein and cellular antigens. *Proc. nat. Acad. Sci.* (1961), *47*, 1667-1680.

[9] Benedict (A.A.), Brown (R.J.) et Ayengar (R.). — Physical properties of antibody to bovine serum albumin as demonstrated by hemagglutination. *J. exp. Med.* (1962), *115*, 195-208.

[10] Bentz (M.). — Analyse immuno-électrophorétique quantitative appliquée à la Trypanosomiase. Publication du Centre Muraz, Bobo-Dioulasso (Haute-Volta) (1962).

[11] Bentz (M.). — Communication personnelle.

[12] Binaghi (R.A.), Halpern (B.N.) et Liacopoulos (P.). — Influence of non specific γ-globulin on passive sensitization of the guinea pig; in Grabar et Miescher : Mechanism of cell and tissue Damage produced by immune reactions. IInd International symposium on Immunopathology, Brook Lodge (1961), Benno Schwabe, éd. Bâle (1962), pp. 123-135.

[13] Biserte (G.), Laturaze (J.) et Havez (R.). — Généralités techniques sur le fractionnement chromatographique des protéines sériques sur cellulose à pouvoir d'échange ionique. *Path. et Biol.* (1961), *9*, 1673-1680.

[14] Bonomo (L.), Pinto (L.), Tursi (A.) et Polosa (T.). — Occurence and characterization of anti-thyroglobulin and anti-nuclear factors in leprosy. Communication aux XI[e] Colloque sur les Protides des Liquides Biologiques, Bruges, mai 1963.

[15] Bouisset (L.), Ducos (J.) et Ruffié (J.). — Technique d'hémagglutination passive dans la recherche de l'immunisation trypanosomienne. *Path. et Biol.* (1960), *8*, 91-98.

[16] Boyd (W.C.). — Fundamentals of immunology; 3[e] éd., 1 vol., 776 p. Interscience, éd. New-York (1956).

[17] Brakke (M.K.). — Zonal separations by density gradient centrifugation. *Arch. Biochem. Biophys.* (1953), *45*, 275-290.

[18] Brambell (F.W.R.), Hemmings (W.A.), Oakley (C.L.) et Porter (R.R.). — The relative transmission of the fraction of papaïn hydrolized homologous γ-globulin from the uterine cavity to the foetal circulation in the rabbit. *Proc. roy. Soc.*, London (1960), Séries *B 151*, 478-482.

[19] Brown (K.N.). — Studies on the immunology of Trypanosomiasis. *Ann. trop. Med. Parasit.* (1961), *55*, 143-144.

[20] Campbell (D.H.), Braker (R.H.) et Pardee (A.B.). — The purification and properties of antibody against p-azophenylarsonic acid and molecular weight studies from light scattering data. *J. Am. Chem. Soc.* (1948), *70*, 2496-2499.

[21] Campbell (D.H.), Sturgeon (R.) et Vinograd (J.R.). — Separation of complete and incomplete Rh antibodies by centrifugation. *Science* (1955), *122*, 1091-1092.

[22] Charmot (G.), Demarchi (J.), Orio (J.), Raynaud (R.) et Vargues (R.). — Le syndrome splénomégalie avec macroglobulinémie. Un nouvel aspect des splénomégalies en Afrique noire. *Press. méd.* (1959), *67*, 11-12.

[23] Christenson (W.N.), Dacie (J.V.), Croucher (B.E.E.) et Charlwood (P.A.). — Electrophoretic studies on sera containing high-titre cold haemagglutinins : identification of the antibody as the cause of an abnormal γ_1 peak. *Brit. J. Haematol.* (1957), *3*, 262-275.

[24] Coventry (F.A.). — The trypanocidal action of specific antiserums on Trypanosoma lewisi in vivo. *Am. J. Hyg.* (1930), *12*, 366-380.

[25] Cunningham (M.P.) et Vickermann (K.). — Antigenic analysis in the Trypanosoma brucei group, using the agglutination reaction. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.* (1962), *56*, 48-59.

[26] Davis (B.D.), Moore (D.H.), Kabat (E.A.) et Harris (A.). — Electrophoretic, ultracentrifugal, and immuno-chemical studies on Wassermann antibody. J. *Immunol.* (1945), *50*, 1-20.

[27] Depoux (R.), Merveille (P.) et Ceccaldi (J.). — Étude de la fixation du complément dans la Trypanosomiase humaine. *Ann. Inst. Pasteur* (1956), *91*, 684-692.

[28] Desowitz (R.S.). — Effect of antibody on the respiration rate of Trypanosoma vivax. *Nature* (1956), *177*, 132-133.

[29] Desowitz (R.S.). — The measurement of antibody occuring in trypanosomal infections of humans and bovines by the respirometric method. Sixth International Congress on Tropical Medicine and Malaria, Lisbon (Portugal) (1958), pp. 75-76.

[30] Desowitz (R.S.). — Studies on immunity and host-parasite relationships. I. The Immunological

response of resistant and susceptible breeds of cattle to trypanosomal challenge. *Ann. trop. Med.* (1959), *53,* 293-313.

[31] Desowitz (R.S.). — Antigenic relationships between polymorphic and monomorphic strains of the brucei group trypanosomes. *J. Immunol.* (1961), *86,* 69-72.

[32] Deutsch (H.F.), Alberty (R.A.) et Gosting (L.J.). Biophysical studies of blood plasma proteins. IV. Separation and purification of a new globulin from normal human plasma. *J. Biol. Chem.* (1946), *165,* 21-35.

[33] Deutsch (H.F.), Alberty (R.A.), Gosting (L.J.) et Williams (J.W.). — Biophysical studies of blood plasma proteins. VI. Immunological properties of γ_1-globulin from the plasma of normal humans. *J. Immunol.* (1947), *56,* 183-194.

[34] Deutsch (H.F.) et Chan (P.C.Y.). — Human serum hemagglutinins. *Fed. Proc.* (1958), *17,* 210.

[35] Deutsch (H.F.) et Morton (J.I.). — Dissociation of human serum macroglobulins. *Science* (1957), *125,* 600.

[36] Deutsch (H.F.) et Morton (J.I.). — Human serum macroglobulins and dissociation units. I. Physicochemical properties. *J. biol. Chem.* (1958), *231,* 1107-1118.

[37] Deutsch (V.). — Constante de sédimentation et poids moléculaire de la réagine syphilitique. *C.R. Acad. Sci.* (1939), *208,* 603-605.

[38] Dodin (A.) et Fromentin (H.). — Réaction d'hémagglutination passive dans la trypanosomiase humaine. Communication à la XI[e] Réunion du Comité Scientifique International de Recherches sur les Trypanosomiases, Dalaba, Guinée (1962).

[39] Dreyfus (B.), Laroche (Cl.), Fritel (D.), Nenna (A.) et Schneider (J.). — Trypanosomiase responsable d'une maladie de Waldenström. *Presse méd.* (1960), *68,* 590-592.

[40] Duke (H.L.) et Wallace (J.M.). — Red cell adhesion in trypanosomiasis of man and animals. *Parasitology* (1930), *22,* 414-456.

[41] Duret (J.). — Recherches expérimentales sur l'antigénécité des trypanosomes. *Thèse,* Bordeaux, n° 3 (1961), Drouillard, éd., Bordeaux.

[42] Epstein (S.I.), Doty (P.) et Boyd (W.C.). — A

thermodynamic study of hapten-antibody association. *J. am. chem. Soc.* (1956), *78*, 3306-3315.

[43] Fahey (J.L.). — Separation of serum antibody activities by anion-exchange cellulose chromatography. *Science* (1960), *131*, 500-501.

[44] Fahey (J.L.) et Horbett (A.P.). — Human γ-globulin fractionation on anion-exchange cellulose columns. *J. biol. Chem.* (1959), *234*, 2645-2651.

[45] Fahey (J.L.) et Humphrey (J.H.). — Antibodies with differing molecular sizes in mice. *Immunology* (1962), *5*, 104-110.

[46] Fahey (J.L.), McCoy (P.F.) et Goulian (M.). — Chromatography of serum proteins in normal and pathological sera. *J. Clin. Invest.* (1958), *37*, 272-284.

[47] Fahey (J.L.) et Morrison (E.G.). — Separation of 6,6S and 18S γ-globulins with isohemagglutinin activity. *J. Lab. Clin. Med.* (1960), *55*, 912-916.

[48] Felton (L.D.). — Dissociation of the specific protein precipitate of antipneumococcus horse serum and a comparison with a protein isolated by chemical means from immune serum. *J. Immunol.* (1932), *22*, 453-467.

[49] Fife (E.H.) et Muschel (L.H.). — Fluorescent-antibody technic for serodiagnosis of Trypanosoma cruzi infection. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* (1959), *101*, 540-543.

[50] Filitti-Wurmser (S.), Aubel-Lesure (G.) et Wurmser (R.). — III. Constantes de sédimentation des isoagglutinines β (A_1O), β (OO) et β (A_1A_1). *J. Chim. Phys.* (1953), *50*, 236-239.

[51] Filitti-Wurmser (S.) et Hartmann (L.). — Séparation des macroglobulines des sérums humains par ultracentrifugation sur solvant piège (barrière de densité). *Bull. Soc Chim. biol.* (1962), *44*, 725-733.

[52] Filitti-Wurmser (S.) et Hartmann (L.). — Études physico-chimiques des macroglobulines purifiées et des sérum humains normaux et pathologiques. *Bull. Soc. Chim. biol.* (1962), *44*, 919-949.

[53] Fink (Ch.W.), Miller (W.E.), Dorward (B.) et LoSpalluto (J.). — The formation of macroglobulin antibodies. II. Studies on neonatal infants and older children. *J. Clin. Invest.* (1962), *41*, 1422-1428.

[54] Fireman (P.), Vannier (W.E.) et Goodman (H.C.). — The association of skin sensitizing antibody with the β_2A-globulins in sera from ragweed sensitive patients. *J. exp. Med.* (1963), *117,* 603-619.

[55] Flodin (P.). — Dextran gels and their application in gel filtration. 1 vol., 85 pp. Pharmacia, ed. Uppsala, Suède) (1962).

[56] Flodin (P.) et Killander (J.). — Fractionation of human serum proteins by gel filtration. *Biochem. Biophys. Acta,* (1962), *63,* 403-410.

[57] Franklin (E.C.). — The structure, function and significance of the immune globulins. *Vox Sang* (1962), *7,* 1-8.

[58] Franklin (E.C.), Holman (H.R.), Müller-Eberhard (H.J.) et Kunkel (H.G.). — An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certains patients with rheumatoid arthritis. *J. exp. Med.* (1957), *105,* 425-438.

[59] Fromentin (H.). — Trypanosomiase humaine accidentelle à T. gambiense. Considérations sur la souche infectante et sur la réponse de l'organisme. *Bull. Soc. Path. exot.* (1959), *52,* 181-188.

[60] Fudenberg (H.H.) et Kunkel (H.G.). — Physical properties of the red cell agglutinins in acquired hemolytic anemia. *J. exp. Med.* (1957), *106,* 689-702.

[61] Fudenberg (H.H.), Kunkel (H.G.) et Franklin (E.C.). — High molecular weight antibodies. *Trans. Int. Congr. Blood Transfusion,* VII Congress Rome (1958).

[62] Goldman (M.). — Staining toxoplasma gondii with fluorescein labelled antibody. II. A new serologic test for antibodies to toxoplasma based upon inhibition of specific staining. *J. exp. Med.* (1957), *105,* 557-593.

[63] Goodman (H.S.). — The relationship of antibody size to hemolytic and complement-fixing activities. *J. exp. Med.* (1957), *105,* 69-72.

[64] Goodmann (H.C.), Fahey (J.C.), Malmgren (R.A.) et Brecher (G.). — Separation of factors in lupus erythematosus serum reacting with components of cell nuclei. *Lancet* (1959), *2,* 382-383.

[65] Goodman (H.S.), Masaitis (L.). — The dissociation of hemolytic antibody from sensitized cells as measured by cell-to-cell transfer. *J. Immunol.* (1960), *85,* 391-397.

[66] Gordon (R.S.). — The preparation and properties of cold hemagglutinin. *J. Immunol.* (1953), *71,* 220-225.

[67] Gray (A.R.). — Precipitating antibody in trypanosomiasis of cattle and other animals. *Nature* (1960), *186,* 1058-1059.

[68] Gray (A.R.). — Soluble antigens of Trypanosoma vivax and of other trypanosomes. *Immunology* (1961), *4,* 253-261.

[69] Gray (A.R.). — Precipitation in agar gel in the study of antigen antibody reaction in African trypanosomiasis. *Ann. trop. Med. Parasit.* (1961), *55,* 142.

[70] Grubb (R.) et Swahn (B.). — Destruction of some agglutinins but not of others by two sulfhydryl compounds. *Acta path. microbiol. Scand.* (1958), *43,* 305-309.

[71] Gyenes (L.), Gordon (J.) et Sehon (A.H.). — Ultracentrifugal characterization of antibodies in sera of ragweed-sensitive individuals. *Immunology* (1961), *4,* 177-191.

[72] Harvey (S.C.). — Some effects of plasma and its fractions on Trypanosoma hippicum. *J. Cellular Comp. Physiol.* (1950), *35,* 371-386.

[73] Havez (R.), Biserte (G.), Leroy (N.), Laturaze (J.) et Boniface (L.). — Applications de la chromatographie sur DEAE-cellulose à l'étude des γ-globulines normales et pathologiques. *Path. et Biol.* (1961), *9,* 1689-1704.

[74] Havez (R.), Boniface (L.), Beerens (H.), Laturaze (J.) et Biserte (G.). — Applications de la chromatographie sur DEAE cellulose à l'étude des antistreptolysines O. *Path. et Biol.* (1961), *9,* 1705-1711.

[75] Havez (R.), Sautière (P.), Sautière (M.) et Biserte (G.). — Comparaison des méthodes de préparation des β_2A-globulines du sérum humain. *C.R. Soc. Biol.* (1962), *156,* 1641-1647.

[76] Heidelberger (M.) et Pedersen (K.O.). — The molecular weight of antibodies. *J. exp. Med.* (1937), *65,* 393-414.

[77] Heimlich (E.M.), Vannier (W.E.) et Campbell (D.H.). — Sedimentation studies of skin sensitizing antibody. *J. Allergy* (1960), *31,* 364-369.

[78] Heremans (J.). — Les globulines sériques du système γ. Un vol. 340 p. Arscia, éd., Bruxelles (1960).

[79] Heremans (J.F.) et Vaerman (J.P.). — β_2A-globulin as a possible carrier of allergic reaginic activity. *Nature* (1962), *193*, 1091.

[80] Heremans (J.F.), Vaerman (J.P.), Carbonara (A.O.), Rodhain (J.A.) et Heremans (M.Th.). — γ_1A-globulin (β_2A-globulin) : its isolation, properties, functions and pathology, in Peeters H. « Protides of the Biological Fluids » 10th Colloquium 1962, Bruges, Elsevier, éd., 1963, pp. 108-128.

[81] Högman (C.F.) et Killander (J.). — The reactivity of blood group A isoantibodies fractionated by DEAE-chromatography and gel filtration in the « mixed agglutination » and « serological adhesion » test. *Acta path. microbiol. Scand.* (1962), *55*, 357-364.

[82] Hooker (S.B.). — Cité par Boyd (16), p. 327.

[83] Hooker (S.B.) et Boyd (W.C.). — Cité par Boyd (16), p. 327.

[84] Humphrey (J.H.) et Porter (R.R.). — Reagin content of chromatographic fractions of human γ-globulin. *Lancet* (1957), *272*, 196-197.

[85] Ingram (D.G.) et Soltys (M.A.). — Immunity in trypanosomiasis. IV. Immuno-conglutinin in animals infected with Trypanosoma brucei. *Parasitology* (1960), *50*, 231-239.

[86] Inoki (S.). — A new experimental method and genetical interpretation on the antigenic variation in Trypanosoma gambiense. *Med. J. Osaka Univ.* (1952), *3*, 81-86.

[87] Inoki (S.). — Studies on antigenic variation in the welcome (*sic*) strain of Trypanosoma gambiense. I. Improvements in technique. *Biken's J.* (1960), *3*, 215-222.

[88] Inoki (S.). — Studies on antigenic variation in the welcome (*sic*) strain of Trypanosoma gambiense. II. On the first relapse appearing in mice treated with human plasma. *Biken's J.* (1960), *3*, 223-228.

[89] Johnson (A.), Woernley (D.) et Pressman (D.). — Sedimentation properties of human and sheep erythrocyte hemolysins. *J. Immunol.* (1957), *79*, 234-237.

[90] Kabat (E.A.). — The molecular weight of antibodies. *J. exp. Med.* (1939), *69*, 103-118.

[91] Kabat (E.A.) et Mayer (MM.). — Experimental immuno-chemistry, 1 vol., 905 p. Charles C. Thomas, éd., Springfield, U.S.A. (1961).

[92] Kabat (E.A.) et Pedersen (K.O.). — The molecular weigh of antibodies. *Science* (1938), *87*, 372.

[93] Kerwick (R.A.) et Mollison (P.L.). — Blood group antibodies associated with the 19S and 7S components of human sera. *Vox Sang.* (1961), *6*, 398-408.

[94] Killander (J.). — Fractionation of antibodies of 19S, 7S and « intermediate » type by gel filtration and ion-exchange chromatography or preparative electrophoresis. Communication au XI[e] Colloque sur les Protides des Liquides Biologiques, Bruges, mai 1963.

[95] Killander (J.) et Flodin (P.). — The fractionation of serum proteins by gel filtration. *Vox Sang.* (1962), *7*, 113.

[96] Kochwa (S.), Rosenfield (R.E.), Tallal (L.) et Wassermann (L.R.). — Isoagglutinins associated with ABO erythroblastosis. *J. Clin. Invest.* (1961), *40*, 874-883.

[97] Korngold (L.), Van Leeuwen (G.) et Brenner (J.L.). — The determination of the molecular weight of different autoprecipitins in Hashimoto's disease by a new immunologic method. *J. Lab. clin. Med.* (1959), *53*, 517-524.

[98] Kunkel (H.G.). — Macroglobulins and high molecular weight antibodies, in Putnam (F.W.). Plasma Proteins, 2 vol. *Academic Press*, New-York (1960), pp. 279-307.

[99] Kunkel (H.G.), Franklin (E.C.) et Müller-Eberhard (H.J.). — Studies on the isolation and characterization of the « rhumatoïd factor ». *J. clin. Invest.* (1959), *38*, 424-434.

[100] Kunkel (H.G.), Rockey (J.H.) et Tomasi (T.). — Methods of separation and properties of antibodies of high molecular weight, in Heidelberger (M.) et Plescia (O.J.), « Immunochemical Approaches to Problems in Microbiology », Rutgers University Press (1961), New Brunswick (U.S.A.), pp. 30-42.

[101] Larivière (M.). — Étude de l'infection expérimentale à Trypanosoma gombiense du Cricetomys gambianus. *Bul. Méd. A.O.F.* (1957), *2*, 122-125.

[102] Laveran (A.). — De l'action du sérum humain sur le trypanosome du Nagana (Tr. brucei). *C.R. Acad. Sci* (1902), *134*, 735-739.

[103] Laveran (A.) et Mesnil (F.). — Sur l'agglutination des trypanosomes du rat par divers sérums. *C.R. Soc. Biol.* (1900), *52*, 939-942.

[104] Laveran (A.) et Mesnil (F.). — Recherches morphologiques et expérimentales sur le trypanosome des rats (Tr. lewisi Kent.). *Ann. Inst. Pasteur* (1901), *15*, 673-714.

[105] Lee-Jones (F.). — Summary of trypanosomiasis research at the Lister Institute of preventive Medicine, Elstree. *Ann. trop. Med. Parasitol.* (1961), *55*, 141-142.

[106] Levaditi (C.) et Mutermilch (St.). — Le mécanisme de la création des variétés de trypanosomes résistant aux anticorps. *C.R. Soc. Biol.* (1909), *61*, 49-51.

[107] LoSpalluto (J.), Chegoriansky (J.), Lewis (A.) et Ziff (M.). — Chromatographic properties of γ-globulin : behavior of serum macroglobulins. *J. Clin. Invest.* (1960), *39*, 473-480.

[108] LoSpalluto (J.), Miller (W.), Dorward (B.) et Fink (C.W.). — The formation of macroglobulin antibodies. I. Studies on adult humans. *J. clin. Invest.* (1962), *41*, 1415-1421.

[109] LoSpalluto (J.) et Ziff (M.). — Chromatographic studies of the rhumatoïd factor. *J. exp. Med.* (1959), *110*, 169-186.

[110] McDuffie (F.C.), Kabat (E.A.), Allen (P.Z.) et Williams (C.A.). — An immuno-chemical study of the relationship of human blood group isoantibodies to γ_1-and γ_2-globulins. *J. Immunol.* (1958), *81*, 48-64.

[111] Manson-Bahr (P.). — Manson's Tropical Diseases, 1 vol. Cassel, éd., Londres (1954).

[112] Massaglia (A.). — Des causes des crises trypanolytiques et des rechutes qui les suivent. *C.R. Acad. Sci.* (1907), *145*, 687-689.

[113] Masseyeff (R.) et Gombert (J.). — Inhibition de la respiration de trypanosomes par le sérum de malades atteints de trypanosomiase à T. gambiense. *Ann. Inst. Pasteur* (1963), *104*, 115-122.

[114] Masseyeff (R.) et Gombert (J.). — Le diagnostic sérologique de la Trypanosomiase à T. gambiense par le test d'inhibition de la respiration des trypanosomes, à paraître in *Bull. et Mém. Fac. Méd et Pharm.*, Dakar (1963), *11*.

[115] Masseyeff (R.), Gombert (J.), Tanguy (U.) et Neuzil (E.). — Contribution à l'étude biochimique de l'hémocyanine de Cymbium neptuni. II. Étude

électrophorétique et immuno-électrophorétique, à paraître in *Bull. Soc. Chim. biol.* (1963), *45*.

[116] Mattern (P.). — β_2-macroglobulinorachie importante chez des malades atteints de trypanosomiase africaine. *Ann. Inst. Pasteur* (1962), *102*, 64-68.

[117] Mattern (P.), Klein (F.), Hijmans (W.) et Radema (H.). — Quelques résultats d'ultracentrifugation de sérums de malades africains hyper macroglobulinémiques. Communication aux III[e] Journées Médicales de Dakar, janvier 1963.

[118] Mattern (P.), Masseyeff (R.), Michel (R.) et Peretti (P.). — Etude immunochimique de la β_2-macroglobuline des sérums de malades atteints de trypanosomiase africaine. *Ann. Inst. Pasteur* (1961), *101*, 382-388.

[119] Mehrotra (T.N.). — Immunological identification of the pathological cold autoantibodies of acquired haemolytic anaemia as β_2-M globulin. *Immunology* (1960), *3*, 265-271.

[120] Mesnil (F.) et Blanchard (M.). — Sensibilité au sérum humain normal de Trypanosomes d'origine humaine. *Bull. Soc. Path. exot.* (1916), *9*, 81-85.

[121] Mesnil (F.) et Brimont (E.). — Sur les propriétés protectrices du sérum des animaux trypanosomés. Races résistantes à ces sérums. *Ann. Inst. Pasteur* (1909), *23*, 129-154.

[122] Mesnil (F.) et Rigenbach (J.). — De l'action des sérums de Primates sur le trypanosome humain de Rhodesia. *C.R. Acad. Sci.* (1911), *153*, 1097-1098.

[123] Neujan (G.), Evens (F.). — Diagnostic et traitement de la maladie du sommeil à T. gambiense. *Acad. roy. Sci. colon., Classe Sci. Nat. Méd.* (1958), *7*, 1.

[124] Nicoli (S.), Bergot (J.) et Demarchi (J.). — Étude des protéines sériques au cours de la trypanosomiase humaine africaine. *Ann. Inst. Pasteur* (1961), *101*, 596-610.

[125] Niel (G.) et Fribourg-Blanc (A.). — Technique actuelle du test d'immuno-fluorescence appliqué au diagnostic de la syphilis. *Ann. Inst. Pasteur* (1962), *102*, 616-628.

[126] Ostrowsky (W.) et Stypulkovsky (C.). — Chromatographic studies of the cold auto-agglutinins. *Clin. Chim. Acta.* (1961), *6*, 254-263.

[127] Ovary (Z.) et Bier (O.G.). — Cité par Binaghi et coll. (12).

[128] Paic (M.M.). — Ultracentrifugation de l'hémolysine. Détermination de sa constante de sédimentation et de son poids moléculaire. *Bull. Soc. Chim. biol.* (1939), *21*, 412-421.

[129] Pautrizel (R.), Duret (J.), Tribouley (J.) et Ripert (Ch.). — Étude de la spécificité de la réaction d'agglutination des trypanosomes au cours des trypanosomoses. *Bull. Soc. Path. exot.* (1962), *55*, 383-390.

[130] Pautrizel (R.), Duret (J.), Tribouley (J.) et Ripert (Ch.). — Application de la réaction de conglutination au diagnostic sérologique des trypanosomes. *Bull. Soc. Path. exot.* (1962), *55*, 391-397.

[131] Pautrizel (R.), Lafaye (A.) et Duret (J.). — Diagnostic sérologique de la maladie du sommeil. I. Amélioration de l'antigène préparé à partir de Trypanosoma equiperdum. *Bull. Soc. Path. exot.* (1959), *52*, 318-331.

[132] Pautrizel (R.), Mattern (P.) et Duret (J.). — Diagnostic sérologique de la maladie du sommeil. II. Les anticorps fixant le complément au cours de l'infection. *Bull. Soc. Path. exot.* (1960), *53*, 878-885.

[133] Pedersen (K.O.). — Ultracentrifugal studies on serums and serum fractions. Almquist et Wiksell, Upsal, Suède, 1945.

[134] Pennel (R.B.). — Fractionation and isolation of purified components by precipitation methods in Putnan (F.W.). The Plasma Proteins, Academic Press éd., New-York (1960).

[135] Perelmutter (L.), Freedman (S.O.) et Sehon (A.H.). Fractionation of sera from ragweed-sensitive individuals by chromatography on DEAE-cellulose. *Int. Arch. Allergy* (1961), *19*, 129-144.

[136] Peterson (F.A.) et Sober (H.J.). — Chromatography of proteins. I. Cellulose ion-exchange adsorbents. *J. am. Chem. Soc.* (1956), *78*, 751-755.

[137] Pike (R.M.), Schulze (M.L.). — Agglutination in rhumatoïd arthritis serum of sheep cells sensitized with hemolysin and infectious mononucleosis agglutinins. *J. Immunol.* (1960), *85*, 523-529.

[138] Pike (R.M.) et Schulze (M.L.). — The distribution of antibodies for erythrocytes in chromatographic fractions of early and late immune sera. *Immunology* (1961), *4*, 425-435.

[139] Polley (M.J.), Mollison (P.L.) et Soothill (J.F.). — The role of 19 S γ-globulin blood-group antibodies in the antiglobulin reaction. *Brit. J. Haemat.* (1962), *8,* 149-162.

[140] Porath (J.). — Gel filtration of proteins, peptides and amino acids. *Biochem. Biophys. Acta.* (1960), *39,* 193-207.

[141] Porter (R.R.). — The fractionation of rabbit γ-globulin by partition chromatography. *Biochem. J.* (1955), *56,* 405-410.

[142] Prager (M.D.), Speer (R.J.), Hill (J.M.), Williams (J.) et Goerner (M.). — Protein fractionation. II. Chromatography of serum proteins of patients with acute leukemia and multiple myeloma. *J. Lab. et Clin. Med.* (1959), *54,* 694-726.

[143] Pressman (D.), James (A.W.), Yagi (Y.), Hiramoto (R.), Woernley (D.) et Maxwell (W.T.). — Rapidly sedimenting properties of specifically precipitating component of a Hashimoto's disease serum. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.* (1957), *96,* 773-777.

[144] Rawson (A.S.) et Abelson (N.M.). — Studies of blood group antibodies. III. Observations on the physicochemical properties of isohemagglutinins and isohemolysins. *J. Immunol.* (1960), *85,* 636-639.

[145] Rawson (A.S.) et Abelson (N.M.). — Studies of blood group antibodies. IV. Physico chemical differences between isoanti-A,B and isoanti-A or isoanti-B. *J. Immunol.* (1960), *85,* 640-647.

[146] Rieckenberg (H.). — Eine neue Immunitätsreaktion bei experimenteller Trypanosemen Infektion die Blutplattchemprobe. *Zeit. Immunitätforsch.* (1917), *26,* 53-64.

[147] Ritz (H.). — Ueber rezidive bei experimenteller Trypanosomiasis. *Arch. Schiffs. u. Tropenhyg.* (1916), *20,* 397-420.

[148] Rockey (J.H.) et Kunkel (H.G.). — Unusual sedimentation and sulphydryl sensitivity of certain isohemagglutinins and skin sensitizing antibody. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* (1962), *110,* 101-105.

[149] Roitt (I.M.), Torrigiani (G.) et Doniach (D.). — Sedimentation characteristics of antibodies in experimental immunisation and in auto-immune diseases. Communication au XI[e] Colloque sur les

Protides des Liquides Biologiques, Bruges, mai 1963.

[150] Rouget (J.). — Contribution à l'étude du Trypanosome des mammifères. *Ann. Inst. Pasteur* (1896), *10*, 716-728.

[151] Sandor (G.). — Sur la présence dans le sérum de cheval à l'état de traces, d'une globuline à 5,5S identique au point de vue immuno-chimique avec la γ_1M-globuline et l'extraordinaire augmentation de son taux lors de l'immunisation par la voie veineuse avec des bactéries. *C.R. Acad. Sci.* (1962), *254*, 768-770.

[152] Sandor (G.) et Pelmont (J.). — Étude de l'euglobuline I des immunsérums « antibactériens » du cheval. Fractionnement sur colonne de diethylamino-éthyl-cellulose et démonstration de l'identité immuno-chimique entre les diverses fractions ainsi obtenues. *C.R. Soc. Biol.* (1961), *155*, 719-722.

[153] Sandor (G.) et Sandor (M.). — Nature des globulines iso-électriquement peu solubles du sérum. Démonstration sur l'exemple des immunsérums de cheval de l'homogénéité immuno-chimique de l'euglobuline 1. *C.R. Acad. Sci.* (1960), *250*, 767-769.

[154] Scheidegger (J.J.). — Une microméthode de l'immuno-électrophorèse. *Int. Arch. Allergy Appl. Im.* (1955), *7*, 103-110.

[155] Schilling. — Bericht über die Surra-Krankheit der Pferde und Rinder im Schutzgebiete Togo. *Zbl. Bakt., I Abt. Orig.* (1902), *31*, 452-459.

[156] Schoenaers (F.), Neujean (G.) et Evens (F.). — Valeur pratique de la réaction de fixation du complément dans la maladie du sommeil à *T. gambiense*. *Ann. Soc. Belge Méd. trop.* (1953), *33*, 141-169.

[157] Schultze (H.E.). — The synthesis of antibodies and proteins. *Clin. Chim. Acta* (1959), *4*, 610-628.

[158] Smith (I.). — Chromatographic and electrophoretic techniques, tome I, 1 vol., 617 p. N. Heinemann éd. Londres, 1960, p. 62.

[159] Sober (H.A.), Gutter (F.I.), Wyckoff (M.M.) et Peterson (E.A.). — Chromatography of proteins. II. Fractionation of serum protein on anion-exchange cellulose. *J. Am. Chem. Soc.* (1956), *78*, 756-763.

[160] Sober (H.A.) et Peterson (E.A.). — Chromatography of proteins on cellulose ion-exchangers. *J. Am. Chem. Soc.* (1954), *76*, 1711-1712.

[161] Soltys (M.A.). — Immunity in trypanosomiasis. I. Neutralization reaction. *Parasitology* (1957), *47*, 375-389.

[162] Soltys (M.A.). — Immunity in trypanosomiasis. II. Agglutination reaction with African trypanosomes. *Parasitology* (1957), *47*, 390-395.

[163] Speer (R.S.), Prager (M.D.), Kelley (T.F.) et Hill (J.M.). — Protein fractionation. I. Chromatography of human serum proteins on DEAE-cellulose with special reference to blood group antibodies. *J. Lab. et Clin. Med.* (1959), *54*, 685-693.

[164] Stanworth (D.R.). — Studies of the physico-chemical properties of reagin to horse dandruff. *Immunology* (1959), *2*, 384-402.

[165] Stelos (P.). — Electrophoretic and ultracentrifugal studies of rabbit hemolysins. *J. Immunol.* (1956), *77*, 396-404.

[166] Stelos (P.). — Comparative study of rabbit hemolysins to various antigens. I. Hemolysins to beef red cells. *J. Infect. Dis.* (1958), *102*, 103-113.

[167] Stelos (P.) et Taliaferro (W.H.). — Comparative study of rabbit hemolysins to various antigens. II. Hemolysins to the Forsmann antigen of guinea-pig Kidney, human type A red cells and sheep red cells. *J. Infect. Dis.* (1959), *104*, 105-118.

[168] Stelos (P.) et Talmage (D.W.). — The separation by starch electrophoresis of two antibodies to sheep red cells differing in hemolytic efficiency. *J. Infect. Dis.* (1957), *100*, 126-135.

[169] Stratton (F.). — Complement-fixing blood group antibodies with special reference to the nature of anti-Le^a. *Nature* (1961), *190*, 240-241.

[170] Svartz (N.), Carlson (L.A.), Schlossmann (K.) et Ehrenberg (A.). — Isolation of the rheumatoïd factor. *Acta. Med. Scand.* (1958), *160*, 87-91.

[171] Taliaferro (W.H.). — A reaction product in infections with Trypanosoma lewisi which inhibits the reproduction of the trypanosomes. *J. Exp. Med.* (1924), *39*, 171-190.

[172] Taliaferro (W.H.). — The immunology of parasitic infections, 1 vol., 414 p. The Century Co éd. New York et London (1929).

[173] Taliaferro (W.H.). — Trypanocidal and reproduction inhibiting antibodies to Trypanosoma lewisi in rats and rabbits. *Am. J. Hyg.* (1932), *16,* 32-84.

[174] Taliaferro (W.H.) et Taliaferro (L.G.). — Complement fixation, precipitin, adhesion, mercuric chloride, and Wassermann tests in equine Trypanosomiasis of Panama (Murrina). *J. Immunol.* (1934), *26,* 193, 213.

[175] Taliaferro (W.H.) et Talmage (D.W.). — Antibodies in the rabbit with different rates of metabolic decay. *J. Infect. Dis.* (1956), *99,* 21-33.

[176] Talmage (D.W.), Freter (G.G.) et Taliaferro (W.H.). — The effect of repeated injections of sheep red cells on the hemolytic and combining capacities of rabbit antiserums. *J. Infect. Dis.* (1956), *98,* 293-299.

[177] Talmage (D.W.), Freter (G.G.) et Taliaferro (W.H.). — Two antibodies of related specificity but different hemolytic efficiency separated by centrifugation. *J. Infect. Dis.* (1956), *98,* 300-305.

[178] Terry (R.J.). — Antibody against Trypanosoma vivax present in normal cotton rat serum. *Exp. Parasit.* (1957), *6,* 404-411.

[179] Thurston (J.P.). — The effect of immune sera on the respiration of Trypanosoma brucei in vitro. *Parasitology* (1958), *48,* 463-467.

[180] Tiselius (A.) et Kabat (E.A.). — An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *J. exp. Med.* (1939), *69,* 119-131.

[181] Uriel (J.) et Grabar (P.). — Emploi de colorants dans l'analyse électrophorétique et immuno-électrophorétique en milieu gélifié. *Ann. Inst. Pasteur* (1956), *90,* 428-440.

[182] Van Loghem (J.J.), Van der Hart (M.), Veenhoven-Van Riesz (E.), Van der Veer (M.), Engelfriet (C.P.) et Peetom (F.). — Cold auto-agglutinins and haemolysins of anti-I and anti-i specificity. *Vox Sang.* (1962), *7,* 214-221.

[183] Van der Scheer (J.), Lagsdin (J.B.) et Wyckoff (R.W.G.). — Electrophoretic and ultracentrifugal analysis of antipneumococcal horse sera. *J. Immunol.* (1941), *41,* 209-223.

[184] Vaucel (M.), Fromentin (H.). — Trypanosomiase experimentale du cobaye. Recherches sur les anti-

corps, in Comité Scientifique International de Recherches sur les Trypanosomiases, Huitième Réunion JOS, 1960, 1 vol., 321 pp. C.C.T.A. éd. Londres Publication n° 62, p. 35.

[185] Waltenström (J.). — Incipient myelomatosis or « essential » hyperglobulinemia with fibrinogenopenia-new syndrome. *Acta Med. Scand.* (1944), *117*, 216-247.

[186] Weber (R.). — Molecular weight of cold hemagglutinins. *Vox. Sang.* (1956), *1*, 37-38.

[187] Weichselbaum (T.E.). — An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Am. J. Clin. Pathol.* (1946), *16*, 40-49.

[188] Weinrach (R.S.) et Talmage (D.M.). — The role of antibody in immune hemolysis. *J. Infect. Dis.* (1958), *102*, 74-80.

[189] Weitz (B.). — The properties of some antigens of Trypanosoma brucei. *J. Gen. Microbiol.* (1960), *23*, 589-600.

[190] Weitz (B.). — Immunity in trypanosomiasis in Goodwin (L.G.) et Nimmo-Smith (R.H.) Drugs, parasites and hosts, 1 vol., 367 pp. J. et A. Churchill, éd. Londres (1962), p. 180.

[191] Wieme (R.J.). — An improved technique of agar gel electrophoresis on agar gel microscopic slides. *Clin. Chim. Acta* (1959), *4*, 317-321.

[192] Williams (C.A.) et Grabar (P.). — Immuno-electrophoretic studies on serum proteins. I. The antigens of human serum. *J. Immunol.* (1955), *74*, 158-168.

[193] Williams (C.A.) et Grabar (P.). — Immuno-electrophoretic studies on serum proteins. II. Immune sera : antibody distribution. *J. Immunol.* (1955), *74*, 397-403.

[194] Williams (C.A.) et Grabar (P.). — Immuno-electrophoretic studies on serum proteins. III. Human γ-globulin. *J. Immunol.* (1955),*74*, 404-410.

[195] Willkens (R.F.), Dreschler (M.) et Larson (D.C.). — Partial purification and properties of lupus erythematosus cell promoting factor. *Proc. Soc. Exp. Biol. et Med.* (1958), *99*, 645-648.

[196] Yokoyama (M.), Finlayson (J.S.), Suchinsky (R.T.) et Roberts (N.F.). — Chemical and serological characteristics of blood group antibodies in the

ABO and Rh systems. *J. Immunol.* (1961), *87*, 56-63.

[197] Yorke (W.). — Auto-agglutination of red blood cells in trypanosomiasis. *Ann. trop. Med. Parasit.* (1911), *4*, 529-552.

[198] Yorke (W.), Adams (A.R.D.) et Murgatroyd (F.). — Studies in chemotherapy. II. The action in vitro of normal human serum on the pathogenic trypanosomes and its significance. *Ann. trop. Med. Parasit.* (1930), *24*, 115-163.

Dépôt légal 2e trim. 63, Aa 410

Imp. Toulousaine (Vve LION), 16, rue Lakanal — TOULOUSE